P-4224

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

INRA-CRV
11. JUIL. 1990
UNITE CENTRALE DE DOCUMENTATION
VERSAILLES

VOL. 18

1989

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

LB-18

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

VOL. 18

1989

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

DES TRAVAUX DU

ANNALES

COMPTES RENDUS

SOMMAIRE

AVANT PROPOS 1

Première Partie : COMPTE RENDU SCIENTIFIQUE

I - Introduction 3

II - Techniques biochimiques

Analyse des pigments photosynthétiques :
(Analusis, 17 (7), 401-404...) 4

III - Biophysique -

Production d'oxygène moléculaire à l'état singulet lors de la péroxydation des catecholamines
(Z. Naturforsch. 44c, 39-44) (et 895-900) 9

IV - Enzymologie

1- Analyse des paramètres cinétiques par compétition de substrats : application aux phosphatases végétales.
(C.R. Soc. Biol., 183, 208-215/314-320/321-328) 16

2- Etude du rôle des tréhalases cérébrales d'insectes...
(C.R. Acad. Sc., 309 III, 121-126) 40
(Comp. Biochem. Physiol., 94 B, 53-57) 47
(Thèse de Doctorat) 52

3- Stabilité des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves d'abeilles placées hors de leurs alvéoles ....
(C.R. Soc. Biol., 183, 130-138) 58
(Thèse Ph.D. en cours)

4- Propriétés des acétyl-cholinestérases du cerveau de l'abeille.
(Thèse de Doctorat) 72

5- Associativité moléculaire dirigeé par le substrat
(Acta Biophys. Biochim., sous presse) 78
(Thèse Ph.D. en cours)

Sommaire (Suite)

(IV. Enzymologie - suite)

6- Paramètres cinétiques de la Fructose-1,6-bisphosphatase rénale de rat
(Thèse Ph.D.) 97

7- Le paramètre Iso comme fonction de la variable (S) 104
- Projet d'ouvrage d'enzymologie 105
8- Régulation biphasique dans les interactions ligands-récepteurs 106

V. Hormones

1- Action des "survivones" sur les lipides d'abeilles
(Horm. Métab. Res., 21, 553-557) 107
2- Action du glucagon chez l'abeille.
(Diab. et Métab.) 113
(Thèse Ph.D.)

VI. Homéostasie de la glycémie, chez l'abeille

1- Influence de la phase lunaire 114
2- Variations homéostasiques et thanatologiques de la tréhalosémie et de la glucosémie des larves du 5e stade placées hors de leurs alvéoles.
(Acta Veterinaria, 39, 227-234) 115
(Thèse Ph.D.)

VII. Toxicologie générale

- Théorie de la létalité
(BioMath., 107, 29-45) 123

(Sommaire - Suite)

VIII - Toxicologie appliquée -

1. Action de la toxine du Bti chez le moustique
(C.R. Soc. Biol., 183, 67-71) 141
+ Pestic. Biochem. Physiol., 34, 86-91 147
+ J. Invert. Pathol., 54, 16-22) 153

2. Lutte contre la Varroose de l'abeille
(Brevets déposés) 160
(Thèse en cours)
- Synergie entre le cuivre et l'amitraz® 161
- Effets non intentionnels subléteux de l'amitraz chez l'abeille
(Biomed. Environ. Sci., 2, 106-114) 162

3. La pollution génotoxique
(Coll. Sc. Front.) 174

4. Interactions toxicologiques hôte/parasite
(Coll. Internat. Phénols Environ.) 175
(Thèse E.P.H.E. en cours)

IX - Mécanismes fondamentaux de la vie
- La Création de la Vie, ... Ed. du Rocher 186

(Sommaire : suite)

X - Enseignement supérieur 187

Deuxième partie :

Compte Rendu financier

I - Introduction 189

II - Crédits 190

III - Débits : par agent 191

par catégorie de dépenses 192

IV - Perspectives 193

AVANT-PROPOS

Parvenu à la fin de 1989, le laboratoire de Biochimie se trouve dans la situation suivante :

Effectifs internes : 1 D.R. (Professeur associé)
1 T.R. (Thèse en cours)

Publications parues : depuis 1976 : 147 titres, dans plus de 30 revues scientifiques internationales différentes

Deux Prix Scientifiques (Sté de Biologie / Collège de France et Acad. des Sc.)

Collaborations extérieures :

Universités de Bordeaux, Montpellier, Nice (Fr.)
Lancaster (G.B.)
Belgrade (Yu)
Szczecin (Pol.)
Ulm (RFA)
Grenade (ESP)
Allahabad (Inde)
Québec (Can.)
...

Budget alloué : actuellement nul -
Perte de 2 postes dont celui assurant le secrétariat / documentation *
(Difficultés matérielles banales constituant seulement la contrepartie d'un choix éthique en faveur de la liberté intellectuelle) -

(*) ce qui explique que ce rapport soit désormais manuscrit

Première partie :

COMPTE-RENDU SCIENTIFIQUE

I - INTRODUCTION

Comme lors des années précédentes, le fil conducteur est donné par la nécessité de connaître le fonctionnement normal d'un organisme de manière suffisamment précise, avant qu'il soit possible d'en détecter les anomalies, c'est à dire les manifestations de toxicité.

Les recherches de base ont porté sur plusieurs points d'enzymologie, théorique et expérimentale, de biochimie et biophysique générales, et de toxicologie théorique et expérimentale.

L'équipe associée à ces recherches comporte:

10 Chercheurs français (Univ. : Bordeaux, Montpellier, Marseille)

9 Chercheurs étrangers (Univ. Grande Bretagne, Yougoslavie, Pologne, Espagne, Rép. Féd. d'Allemagne)

Deux thèses ont été soutenues et 13 manuscrit publiés, ainsi que plusieurs communications présentées en colloques et trois brevets déposés.

II _ TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

L'analyse des pigments photosynthétique constitue une opération de base pour les recherches envisageées en toxicologie végétale.

Les méthodes antérieures, développées en CCM sur plaques de Silice, présentaient des inconvé-nients maintenant résolus, comme le montre la publication ci jointe.

Mais de nouvelles méthodes beaucoup plus simples et performantes sont en fin de mise au point et feront l'objet de publication en 1990.

Ces recherches sont confiées à Mme Daurade-le Vagueresse, et comportent une collaboration avec le laboratoire de Chimie Analytique de l'Universite de Marseille (Professeur A. Siouffi) et avec la Société Merck (Dr. J.M. Fortes).

Analusis, 1989, v. *17*, n° 7, p. 401-404

Regression de l'oxydation artéfactuelle des pigments chlorophylliens chromatographiés sur couches minces de gel de silice, par imprégnation des plaques au glucose ou au thiosulfate

M. BOUNIAS et M.H. DAURADE

Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, Boîte Postale 91, 84140 Montfavet (France)

SUMMARY

Quenching of the artifactual oxidation of chlorophyll pigments chromarographed on silicagel thin layers by impregnation of plates with glucose or thiosulfate.

Chromatography of photosynthetic pigments on silicagel thin layers offers a good resolution but facilitates the artifactual oxidation of chlorophylls previously fragilized by the conditions of extraction and/or the physiological state of the plant. The impregnation of plates with 10 to 20 mM thiosulphate completely restores the primary structure of chlorophylls, but alters the structure of carotenoids. A compromise is obtained by impregnating the plates with a mild reductor: D glucose (125 mM) which preserves the carotenoids integrity while exhibiting a satisfactory (85%) antioxidant capacity towards chlorophylls.

Key-words : TLC Silicagel. Quantification. Chlorophylls a and b. β carotene. Lutein. Artifact.

RÉSUMÉ

La chromatographie des pigments photosynthétiques sur couches minces de gel de silice présente, en contrepartie d'une bonne résolution, l'inconvénient de faciliter la dégradation oxydative des chlorophylles ayant été préalablement fragilisées par les conditions d'extraction et/ou l'état physiologique du végétal. L'imprégnation des plaques par le thiosulfate (10 à 20 mM) rétablit complètement la structure primitive des chlorophylles, mais altère celle des caroténoïdes. Un compromis est obtenu avec l'imprégnation des plaques par un réducteur doux, le D-glucose (125 mM) qui préserve l'intégrité des caroténoïdes tout en présentant une efficacité réductrice satisfaisante (85 %) vis-à-vis des chlorophylles pré-altérées.

Mots-clés : CCM gel de silice. Dosage chlorophylles a et b. β carotène. Lutéine. Artefact. Thiosulfate.

INTRODUCTION

Le gel de silice reste l'une des phases solides les plus employées, en chromatographie en couche mince, en attendant que se développent des techniques utilisant les nouvelles couches maintenant disponibles. Il constitue, en particulier, un matériau de choix pour la résolution des divers pigments photosynthétiques [1]. Malheureusement, si les caroténoïdes ne posent guère de problèmes, il en va différemment des chlorophylles, et plus particulièrement de la chlorophylle a, dont le gel de silice tend à favoriser d'autant plus l'autoxydation que la molécule se trouve sous une forme sensibilisée par les conditions d'extraction, d'une part et par l'état physiologique du végétal, d'autre part. Il en résulte une décomposition des formes initiales en dérivés *a'*, *a''*, *b'*, *b''* qui représentent des stades successifs d'oxydation [2-4]. Nous avons donc cherché à éviter l'autoxydation des pigments en cours de migration (ce qui se traduit par des traînées et une multiplication des taches), et même à rétablir des formes préoxydées à l'état réduit initial, au moyen de traitements réducteurs tels que le dithionite [5]. Ceux-ci pouvant, malheureusement, réduire le β carotène et atténuer son absorbance, nous avons cherché un moyen terme entre l'efficacité réductrice vis-à-vis des chlorophylles et la préservation de la structure du β carotène.

Manuscrit reçu le 23 septembre 1988; manuscrit modifié reçu le 18 novembre 1988; accepté le 21 novembre 1988.

MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Les chlorophylles *a* et *b*, le β carotène et le lutéine à l'état pur ont été fournis par Sigma (réf. resp. : C5753, C5878, CO126 et X6250).

Les pigments chlorophylliens, extraits ou dissous dans le chloroforme, sont déposés sur plaques de gel de silice 60 préfabriquées sur support plastique (Merck, TLC réf. n° 5748). Les opérations d'imprégnation sont effectuées par trempage.

Les migrations s'effectuent à 19 ± 1 °C à l'obscurité au moyen d'un solvant binaire composé du mélange heptane/acétate d'éthyle, dans les proportions variant de 45/55 à 55/45 (*v/v*) *(fig. 1)*. L'enrichissement en cyclohexane réduit les mobilités et augmente l'écart entre β carotène et les pigments porphyriniques. Les distances de migration sont de l'ordre de 35 ± 5 mm.

Les enregistrements sont effectués à l'aide d'un spectrodensitomètre Shimadzu CS 930, à la longueur d'onde = 425 nm qui offre l'absorbance la plus homogène pour l'ensemble des chlorophylles et caroténoïdes.

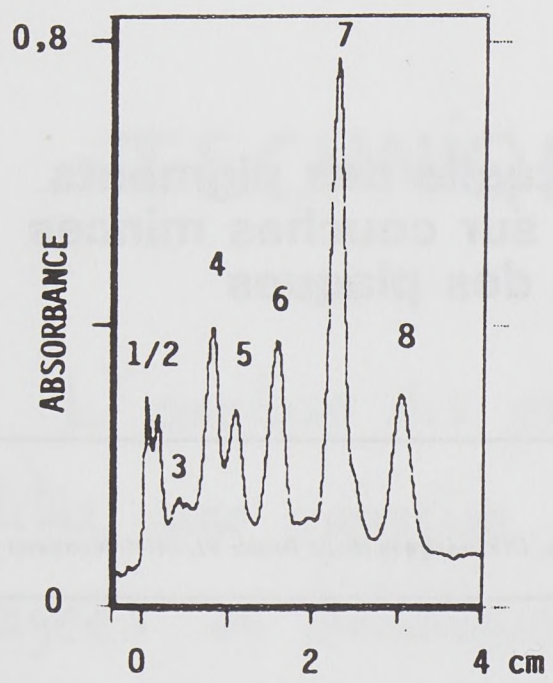


FIG. 1. — *Chromatogramme de pigments photosynthétiques extraits de feuilles de bouleaux.*
Solvant : heptane-acétate d'éthyle (55/45, *v/v*), température 18 °C. Durée 4 min 30. 1/2 = Phéophorbides et néoxanthine; 3 = Violaxanthine; 4 = Lutéine; 5 = Chlorophylle (b); 6 = chlorophylle (a); 7 = Phéophytine (a); 8 = β carotène.

FIG. 1. — *Chromatogram of photosynthetic pigments from Birchtree leaves.*
Solvent : heptane-ethyle acetate (55/45, *v/v*). Temperature 18 °C. Duration : 4.5 min. 1/2 = Pheophorbids and Neoxanthin; 3 = Violaxanthin; 4 = Lutein; 5 = Chlorophyll (b); 6 = chlorophyll (a); 7 = Phaeophytin (a); 8 = β carotene.

RÉSULTATS

A) Protection des chlorophylles

La *figure 2* illustre quelques exemples de l'état initial d'oxydation, se traduisant sur plaques non traitées par l'apparition de 3 à 5 formes dégradées, et du retour, sous l'action des agents réducteurs, à une forme moléculaire principale correspondant à l'état naturel réduit.

La *figure 3* précise les variations du taux d'efficacité des traitements en fonction des concentrations en réducteurs, thiosulfate et glucose. La proportion de molécules réduites relativement à l'ensemble des formes présentes, atteint 92 % avec 20 mM de thiosulfate et près de 80 % avec 125 mM de glucose.

Le traitement des plaques ne modifie ni les paramètres de migration, ni la position des pics du spectre d'absorbance des chlorophylles tel qu'il est possible de la mesurer en phase solide [6]. Les courbes d'étalonnage des chlorophylles établies en présence de thiosulfate ou de glucose présentent des coefficients logarithmiques d'expansion linéaire (x, tel que $S^x = p.C$ où S = surface du pic, C = quantité déposée et p = coefficient d'étalonnage [7]) légèrement supérieurs à 1 *(tableau I)*.

TABLEAU I. — *Coefficients exponentiels* (x) *de linéarisation des courbes d'étalonnage des chlorophylles et caroténoïdes sur plaques de gel de silice imprégnées d'anti oxydants* (moyennes ± écarts-types pour N = 3 mesures indépendantes). (Surface de pic)^x = p. (concentration).

TABLE I. — *Exponential coefficients* (x) *corresponding to the linearization of calibration curves of chlorophylls and carotenoïds on silicagel precoated sheets impregnated with anti-oxidants.* (Means ± S.D. for 3 independant determinations). (Peak area)^x = p. (concentration).

	$Na_2S_2O_3$ (10 mM)	Glucose (10 mM)
chlorophylle (a)	1,44 ± 0,20	1,10 ± 0,05
chlorophylle (b)	1,33 ± 0,30	1,18 ± 0,18
β carotène	—	1,07 ± 0,15
lutéine	—	1,58 ± 0,17

B) Répercussions sur les caroténoïdes

La *figure 4A* présente les résultats obtenus sur le β carotène en fonction du temps et des concentrations d'antioxydants. En l'absence de traitement, l'absorbance de la molécule décroît à la vitesse constante de 4,8 ± 0,2 % de la valeur initiale par heure. En présence de glucose, à la concentration de 125 mM, cette diminution reste comparable : 4,2 ± 0,4 % par heure. Par contre, la décroissance devient extrêmement importante en présence de thiosulfate : elle est alors de type hyperbolique, avec un taux initial moyen de l'ordre de 38,5 ± 11,5 % au cours des premières 45 min. Le temps nécessaire aux dépôts et aux migrations suffit à abaisser de près de 40 % les résultats des premières mesures effectuées aussitôt après le développement. La *figure 4C* montre, en revanche, que l'absorbance du β carotène ne décroît pas en fonction des doses croissantes de glucose. Le spectre du β carotène n'est pas affecté par l'imprégnation au glucose [6] et sa courbe d'étalonnage est linéaire *(tableau I)*.

L'absorbance de la lutéine décroît linéairement de 5,0 ± 1,0 % par heure au cours des 5 h qui suivent le développement, sur plaques imprégnées de glucose (10 mM) *(fig. 4B)*. Cette décroissance correspond à une dégradation spontanée et reste indépendante de la présence du glucose dont les concentrations croissantes ne montrent aucun effet significatif *(fig. 4D)*.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'imprégnation des plaques recouvertes de gel de silice par le thiosulfate (10 à 20 mM) permet de restaurer chacune des chlorophylles (a) et (b) dans sa forme principale originelle, dans des conditions où l'absence de traitement conduirait à l'apparition de traînées en cours de développement ou à la séparation de deux à trois formes majoritaires préoxydées.

Un tel résultat n'est pas atteint par le traitement des plaques au chlorure de magnésium qui permet seulement d'éviter la dégradation trop rapide des chlorophylles en phéophytines par perte du noyau de magnésium de la porphyrine [5].

Malheureusement, le pouvoir réducteur du thiosulfate est tel qu'il entraîne une altération de la structure chromophore du β carotène, faite de doubles liaisons conjuguées, et entraîne rapidement une importante perte d'absorbance de ce pigment sur les plaques.

Le recours à un réducteur doux, le D-Glucose, offre un compromis permettant à la fois de préserver l'intégrité de la structure des caroténoïdes, et de rétablir celle de la structure des chlorophylles, lorsque celles-ci se présentent dans un état de déstabilisation moléculaire, dans une proportion atteignant 85 % de l'efficacité du thiosulfate.

L'amélioration ainsi apportée à la chromatographie

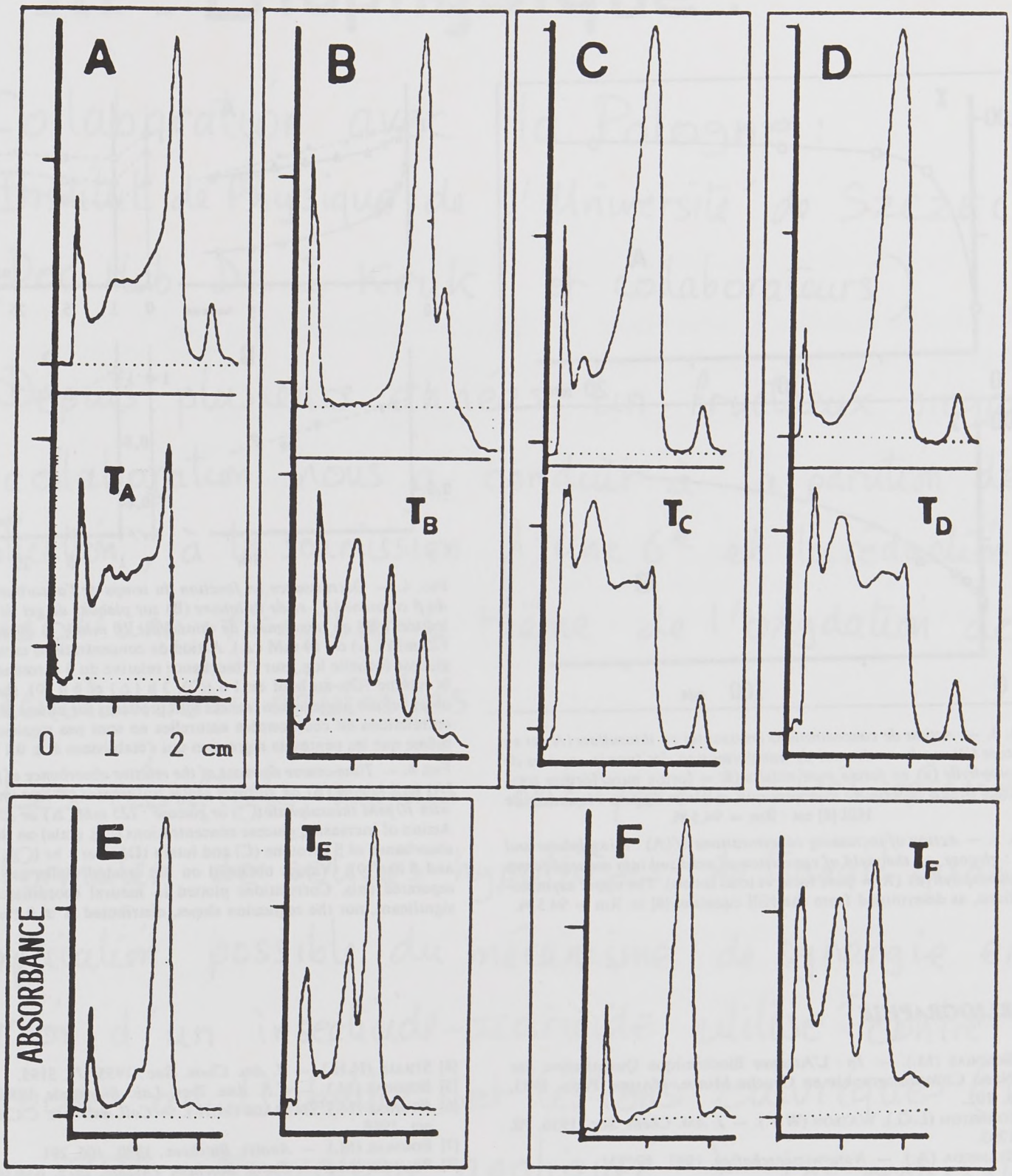


FIG. 2. — *Effets qualitatifs des agents réducteurs sur la distribution des formes moléculaires des chlorophylles* (0,8 nanomole) *chromatographiées sur gel de silice.*
Chlorophylle (a) : A = Glc 1 mM; B = Glc 125 mM; C = thiosulfate 2,5 mM; D = thiosulfate 20 mM; chlorophylle (b) : E = Glc 1 mM; F = thiosulfate 10 mM. T = témoins correspondants sur plaques non traitées. Abscisses et ordonnées : comme sur la *figure 1.*

FIG. 2. — *Qualitative effects of reductive agents on the molecular pattern of chlorophylls* (0.8 nanomol) *chromatographed on silicagel.*
Chlorophyll (a) : A = Glc 1 mM; B = Glc 125 mM; C = thiosulphate 2,5 mM; D = thiosulphate 20 mM; chlorophylle (b) : E = Glc 1 mM; F = thiosulphate 10 mM. T = controls corresponding to not treated plates. Abscissa and ordinate as on *figure 1.*

des pigments photosynthétiques sur couches minces de gel de silice, devrait permettre de continuer à exploiter les capacités résolutives de cette phase, en attendant la mise au point de nouvelles méthodes sur des phases de type inverse que l'on peut espérer moins agressives vis-à-vis de la structure des pigments.

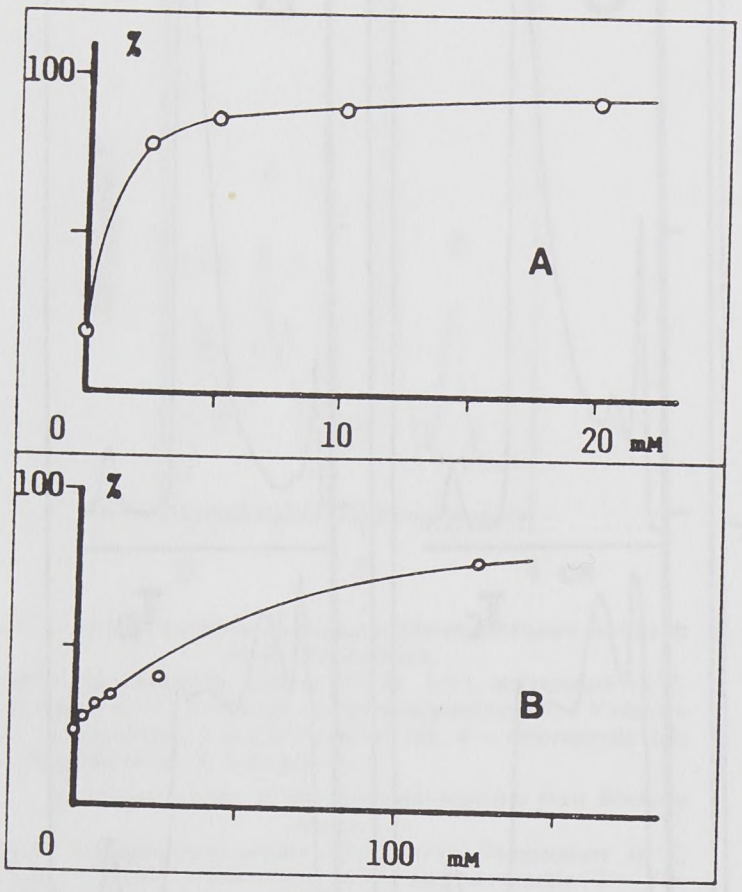


FIG. 3. — *Action de concentrations croissantes en thiosulfate* (A) *et en glucose* (B) *sur le rendement de transformation des formes oxydées de chlorophylle* (a) *en forme pure réduite* (R = forme pure/formes totales). La limite supérieure asymptotique, calculée d'après l'équation de Hill [8] est : Rm = 94,5 %.

FIG. 3. — *Action of increasing concentrations of* (A) : *thiosulphate and* (B) : *glucose, on the yield of conversion of oxidized into reduced forms of chlorophyll* (a). (R = pure form vs total forms). The upper asymptotic limit, as determined from the Hill equation [8] is: Rm = 94.5 %.

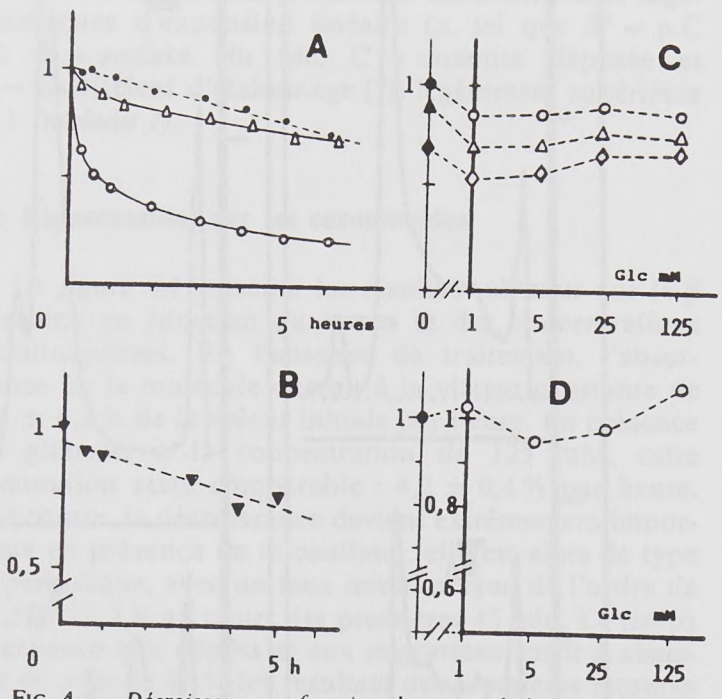


FIG. 4. — *Décroissance en fonction du temps de l'absorbance relative du β carotène* (A) *et de la lutéine* (B) *sur plaques de gel de silice non traitées* (●) *ou imprégnées de thiosulfate 10 mM* (◯) *ou de glucose :* 125 mM (△) ou 10 mM (▲). Action de concentrations croissantes de glucose (échelle log.) sur l'absorbance relative du β carotène (C) et de la lutéine (D), au bout de 1 h (◯), 3 h (△) et 6 h (◇). (Les valeurs obtenues sur plaques non traitées sont précisées sur un axe séparé). Les corrélations en coordonnées naturelles ne sont pas significatives, de même que les pentes de régression qui s'établissent à ± 0,1 %·mM^{-1}.

FIG. 4. — *Time-course decrease of the relative absorbance of β carotène* (A) *and luteine* (B) *on silicagel plates not treated* (●) *or impregnated with 10 mM thiosulphate* (◯) *or glucose : 125 mM* (△) *or 10 mM* (▲). Action of increasing glucose concentrations (log. scale) on the relative absorbance of β carotène (C) and lutein (D) after 1 hr (◯), 3 hrs (△) and 6 hrs (◇). (Values obtained on not treated plates are given on separated axis. Correlations plotted in natural coordinates are not significant, nor the regression slopes, distributed at ± 0.1%·mM^{-1}.

BIBLIOGRAPHIE

[1] BOUNIAS (M.). — *In :* L'Analyse Biochimique Quantitative par Nano Chromatographie en Couche Mince, *Masson*, Paris, 1983, p. 102.
[2] JOHNSTON (L.G.), WATSON (W.F.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, *78*, 1203.
[3] STANIEDA (A.). — *Naturwissenschaften*, 1963, *50*, 731.
[4] STRAIN (H.H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, *77*, 5195.
[5] BOUNIAS (M.). — *C.R. Ann. Trav. Lab. Biochimie*, 1984, *13*, 52.
[6] BOUNIAS (M.), DAURADE (M.H.). — *Coll. Internat. C.C.M.*, Paris, oct. 1988.
[7] BOUNIAS (M.). — *Analyt. Biochem.*, 1980, *106*, 291.
[8] BOUNIAS (M.). — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, *63B*, 407.

III - Biophysique.

Collaboration avec la Pologne :
Institut de Physique de l'Université de SZCZECIN
(Doc. Hab. Dr. I. Kruk et collaborateurs)

Depuis plusieurs années un fructueux programme de collaboration nous a conduit à la parution de 5 publication, à la soumission d'une 6e et la rédaction en cours d'une 7e, sur le thème de l'oxydation des catécholamines naturelles.

Les résultats acquis ont permis, très récemment, de formuler de solides hypothèses de travail quant à l'explication possible du mécanisme de synergie entre l'action d'un insecticide-acaricide utilisé contre la varroose de l'abeille et les ions cuivriques (voir chap. VIII : toxicologie appliquée). Les recherches, dans cette voie, se poursuivent et devraient aboutir au cours de 1990 -

Les émissions de chimio luminescence qui accompagnent la péroxydation de la Dopa et de la Dopamine ont été mesurées entre 180 et 800nm. La mise en œuvre d'un détecteur a infra-rouges a permis d'approfondir l'étude et de l'étendre à la noradrenaline et à l'adrénaline, dans la gamme de 1000 à 1300nm - Ce dernier Travail, dont les tirés à part parviendront ultérieurement, est accepté dans :
Z. Naturforsch., 1989, 44c, 895-900 -

10

Evidence for the Generation of Singlet Molecular Oxygen during Dopa and Dopamine Peroxidation

Irena Kruk, Krzysztof Lichszteld, and Teresa Michalska

Institute of Physics, Technical University of Szczecin,
Al. Piastów 48/49, 70-310 Szczecin, Poland

Michel Bounias

Biochemistry Laboratory, INRA, Avignon Research Center,
P.O. Box No. 91, F-84140 Cantarel-Montfavet, France

Z. Naturforsch. **44c**, 39–44 (1989); received July 18/October 10, 1988

Dopa, Dopamine, Singlet Molecular Oxygen, Chemiluminescence

Participation of singlet molecular oxygen ($^1O_2$) in peroxidation of dopa and dopamine was studied by measurements of chemiluminescence spectra, the influence of solvents with various lifetime of O_2 ($^1\Delta_g$) and O_2 ($^1\Delta_g$)-quenchers on quantum yield of chemiluminescence.

A decrease of absorption and fluorescence intensities of 1,3-diphenylizobenzofuran (DPBF) was also studied in the presence of dopa and dopamine oxidized with alkaline H_2O_2 as a criterion for the involvement of $^1O_2$.

It is well known that low-level chemiluminescence (CL) accompanies to the autoxidation process of some biological important polyphenols [1–3]. The same chemiluminescent phenomena can be expected to occur under physiological conditions.

We have recently observed the light emission and the generation of potential cytotoxity radicals such as $O_2^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$ and H_2O_2 during oxidation of biogenic catecholamines [4, 5]. The spectroscopic data indicated that another highly reactive species *e.g.* singlet molecular oxygen, abbreviated $^1O_2$, is one of the CL emitters.

It is noteworthy that the catecholamine regulatory systems are widespread in the Animal Kingdom and particularly in Insects such as honeybees, where strong hyperglycemic responses have been evidenced as a characteristic consequence of the *in vivo* injection of aminergic derivatives [6]. In this case, it has been observed that rapid alterations of the injected solutions may occur and result in changes of the hyperglycemic response, involving the quenching of glucose increase and a delay in the trehalose peaking [7]. Obviously, if $^1O_2$ were to be generated in oxidation reactions of the natural aminergic hormones, and come across the regulatory process, then this species as well as their precursors ($O_2^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$) would influence the hyperglycemia level.

Reprint requests to Prof. Dr. I. Kruk.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/89/0100–0039 $ 01.30/0

In this paper we describe further chemiluminescent-evidence for the generation of $^1O_2$ in dopa and dopamine peroxidation reactions.

Materials and Methods

Dopamine, was obtained from EGS-Chem. (Germany); D,L-dopa Aldrich; 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) twice recrystallized from benzene was Fluka AG, Buchs; heavy water (D_2O) 99.8% was from IBJ Świerk (Poland).

Compounds employed as quenchers of $^1O_2$ were obtained from Merck. Other reagent were of analytical grade from POCH, Gliwice (Poland). The pD values of the heavy water solutions were measured with a glass electrode using phosphate salts dissolved in D_2O and applying a correction of +0.4 pH. Universal buffer according to Britton and 0.15 M phosphate buffers were used. The solutions were prepared before experiments in redestilled water.

Chemiluminescence intensity was measured by means of a M12FQC51 photomultiplier with S20 cathode operating jointly with a K-200 recorder (G.D.R.). The quantum yields of CL were determined by the method of Stauff and Schmidkunz [8].

In spite of low quantum yields of dopa and dopamine chemiluminescence, conventional equipment could not be used in order to perform a spectral analysis of the emitted light. Therefore, a set of cut-off filters GOST9411–66 consisting of coloured glass and an EMI9558QB photomultiplier sensitive in the

range 180–800 nm cooled to 203 K were used for that purpose according to the method described by Vassiliev [9]. The single photon counting technique was applied. The width of each rectangle is equal to the half spectral width of the difference in transmission of each pair of filters providing one experimental point.

Fluorescence spectra were measured with a Hitachi MPF-3 spectrofluorimeter and fluorescence kinetics with a spectrofluorimeter consisting of monochromators SPM-2, M12FQC51 photomultiplier and K-200 recorder.

The absorption measurements were made using a Zeiss Specord UV-VIS spectrophotometer.

All experiments were done at least in triplicate. Data are reported as the mean ± S.D.

Results

The main criterion for the involvement of $^1O_2$ in chemical and biological systems apart from spectral analysis is a demonstration of an enhancement of chemiluminescence quantum yield ($\emptyset_{CL}$) as well as maximum intensity (I_{max}) in solvent in which O_2 ($^1\Delta_g$) has longer lifetime (τ) than in water [10, 11].

The second very important criterion for the presence of this very reactive species is the inhibition of the above mentioned parameters of CL by the specific quenchers of $^1O_2$ [12, 13]. We have used both criteria as a diagnostic test of the intermediacy of $^1O_2$.

Quantum yields

The autoxidation of alkaline solutions of dopa and dopamine in the presence of molecular oxygen is accompanied by CL. The quantum yields of these reactions were estimated to be about 10^{-12} photons/catecholamine molecule. The addition of H_2O_2 to the above solutions of dopa and dopamine leads to a large increase in the light intensity as well as the quantum yields. Both values have been measured in several solvents, and these values are collected in Table I. The data obtained indicate the increase of luminescence in methanol and ethanol in comparison with water by the factors which correlate with lifetimes of $^1O_2$ in these solvents [10]. In the case of D_2O the observed increase in emission intensity and quantum yield is lower than that expected from the τ_{D_2O}/τ_{H_2O} ratio. These values are clearly destored due to the following factors: D_2O solutions contained more than 0.5% H_2O. The lifetime of $O_2(^1\Delta_g)$ ranges from 3.1 μs in H_2O to approximately 67.0 μs in D_2O [14], so radiationless decay of $O_2(^1\Delta_g)$ is very fast in water. Moreover, the rate constant of the H_2O_2 decomposition is less in D_2O than in H_2O as well as the amounts of formed $^1O_2$ escaping into gas bubbles may be also different in both solvents [10]. This can explain why the observed increase in the CL intensity is not such high as it results from the prolongated lifetime of $^1O_2$ in deuterated solvent.

If the measured emission comes from radiative deactivation of $^1O_2$-dimols the influence of $O_2(^1\Delta_g)$ lifetime (τ) in different solvents on the quantum yield ($\emptyset_{CL}$) could be described by the following expression [15];

$$\sqrt{\emptyset_{CL}} = \alpha \cdot \tau,$$

where α = const. for a given substrate system.

The plot of $\sqrt{\emptyset_{CL}}$ *vs.* lifetime of $O_2(^1\Delta_g)$ in the linear scale is represented by a straight line for both investigated systems (Fig. 1). The results of these kinetic experiments confirm the generation of $^1O_2$ as the major light-emitting species.

Table I. The influence of solvents on the maximum intensity (I_{max}) and the quantum yield (Ø) of chemiluminescence. Conditions: 1 mM dopa, 1 mM dopamine, 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O_2, ph 11.2, temperature 310 K. Lifetimes of $O_2(^1\Delta_g)$ were taken from [10, 14]. AH denotes dopa or dopamine molecule.

Solvent	τ [μs]	I_{max}		Ø × 10^{10}		hv/AH	
		Dopa	Dopamine	Dopa		Dopamine	
H_2O	3.1 ± 0.3	96 ± 7	236 ± 17	7.3 ± 0.7	78.0 ± 8		
CH_3OH	7.0 ± 0.7	556 ± 21	3066 ± 140	288.0 ± 15	229.0 ± 12		
C_2H_5OH	10.8 ± 1.0	2710 ± 85	25055 ± 1100	1210.0 ± 60	322.0 ± 16		
D_2O	67.0 ± 7.0	296 ± 14	610 ± 53	9.9 ± 1.0	108.0 ± 10		

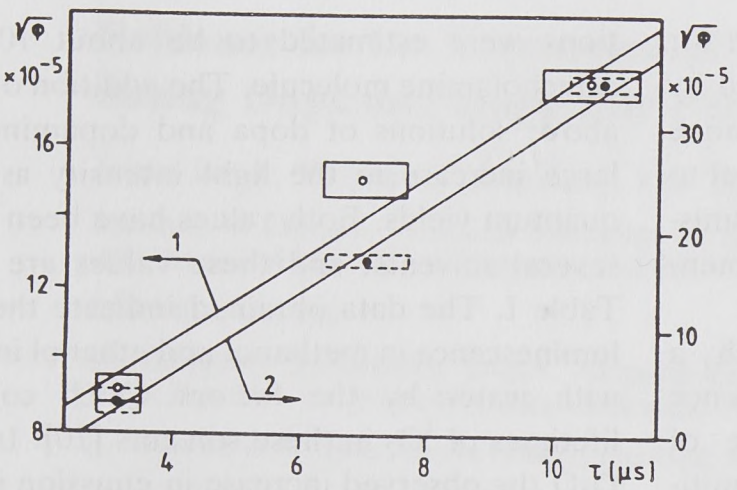


Fig. 1. Plots of $\sqrt{\emptyset}$ *vs.* lifetime of solvent for dopamine (1) and dopa (2). Under the same conditions as in Table I. Horizontal segments approximate the experimental errors of lifetimes determination taken from [10, 14]. Vertical segments represent standard deviation (n-5).

Spectral distribution of chemiluminescence

The spectral distribution of CL from dopa and dopamine was measured in different solvents to check the enhancement of $^1O_2$-dimols emission due to the solvent kind (Fig. 2). The spectra are spread through the full visible region and have four emission maxima at around 480–500, 580, 640 and 700 nm. The fluorescence bands of the reaction mixture match only the broad blue-green band of CL spectra (depicted as a dotted line). General properties of CL from dopa and dopamine peroxidation in water and D_2O were described in previous papers [4, 5], and the blue-green bands were attributed to the fluorescence of the dopa and dopamine oxidation products. Also an emission from excited singlet and/or triplet carbonyl-containing products formed during the decomposition of a dioxetane intermediate may also be involved in the 440–560 nm region [16]. As is well known, excited triplet states are strongly quenched by molecular oxygen, this, indeed, was present at large concentration in the investigated reactions. Hence, one can suppose that the contribution of this emitter to the 480 nm band is rather small. The contribution to a total emission of the red light CL bands around 640 and 700 nm depends on the kind of the solvent used and it reaches the greatest value in ethanol. The red bands intensity increase distinctly with lifetime of $O_2(^1\Delta_g)$ in applied solvents. Emission bands at 580, 640 and 700 nm are found to be the luminescence from $^1O_2$-dimols $2\,|^1\Delta_g| \rightarrow 2\,|^3\Sigma_g^-|$. Additionally, a weak CL can participate at 480 nm, which corresponds to the $|^1\Delta_g, {}^1\Sigma_g^+| \rightarrow 2\,|^3\Sigma_g^-|$ transition.

The effect of $^1O_2$-quenchers

In order to elucidate the contribution of $^1O_2$ to the observed CL from our systems, the influence of some

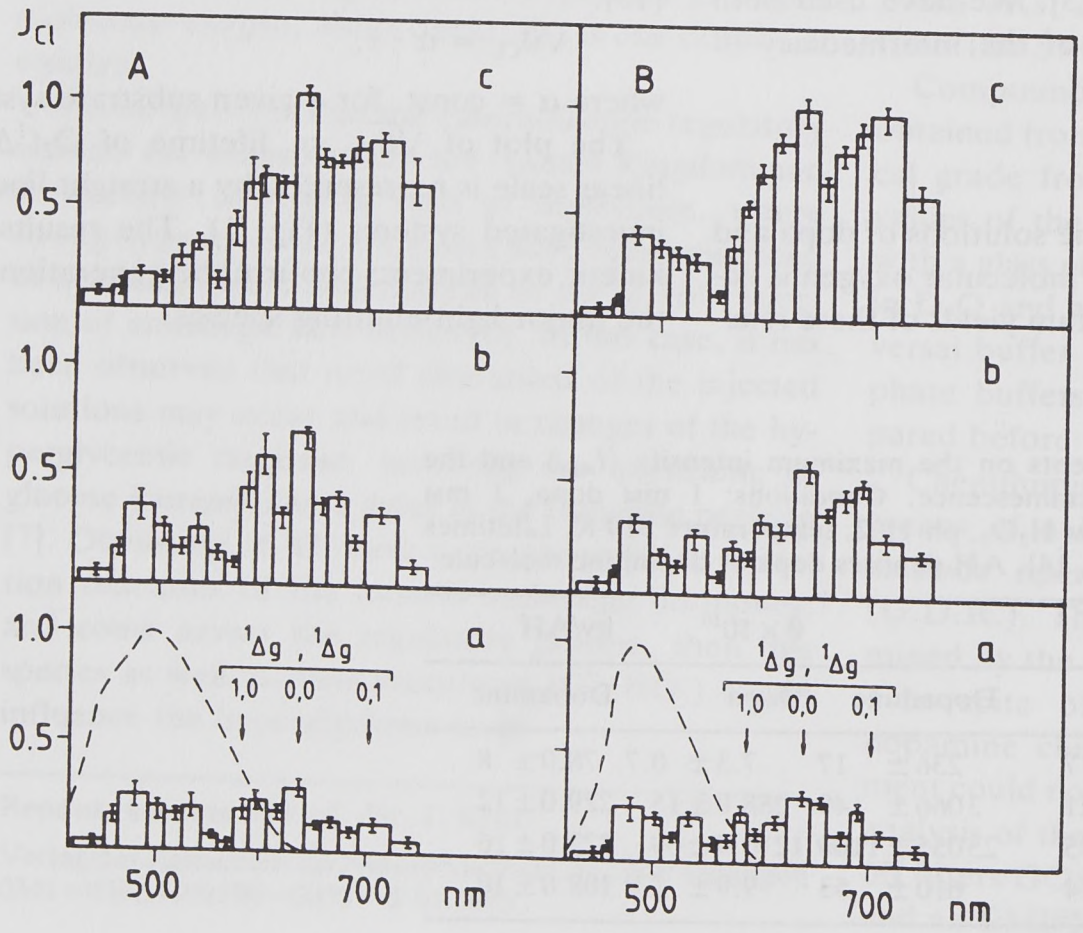


Fig. 2. Spectral distribution of chemiluminescence and fluorescence from the reaction of dopa (A) and dopamine (B) with H_2O_2 in H_2O(a), D_2O(b), C_2H_5OH(c). Experimental conditions as in Table I. The spectra were measured after 20 min from the beginning of dopa and dopamine peroxidation. The height of the rectangle corresponds to the mean value of 10 measurement of the relative intensity. The size of the bars approximates the S.D.

$^1O_2$-quenchers has been investigated quantitatively. The quenchers added to the reaction mixtures reduced the CL intensity and the quantum yield according to the Stern-Volmer equation. The rate constants for the quenching of $^1O_2$-(k_q) are summarized in Table II. The values for k_q determined in this work do not differ significantly from those reported by the other authors [13]. The obvious conclusion is that the quenchers reactivity is similar in each of the investigated systems (with dopa and dopamine), but that the precision for the determination of k_q by our method is not excellent. Other quenchers of $^1O_2$ as DPBF, hydroquinone, tryptofan, also quench clearly CL of dopa and dopamine, but their effect has been studied only qualitatively.

DPBF is widely used as the $^1O_2$ scavenger. Its usage is based on the decrease of the absorption as well as fluorescence due to the oxidation by $^1O_2$ [17]. The rate of disappearance of DPBF was followed by monitoring the decrease in absorption at 415 nm and fluorescence intensity at 458 nm in the presence of different reactants of CL mixture as a function of time (Fig. 3). The rate of DPBF bleaching depends on the presence of particular reactants and it is the highest for the systems exhibiting the greatest values of the maximum intensity and the quantum yield of CL *e.g.* for the dopa or dopamine $+Co^{2+} + H_2O_2 +$ pH system.

The system of $Co^{2+} + H_2O_2 +$ pH also causes the bleaching of the DPBF absorption as well as the fluorescence quenching of DPBF, since it emitts CL and $^1O_2$ has been postulated as the emitting species [18].

The interaction of DPBF with particular reactants were also investigated spectroscopically. They appeared to be negligible under our experimental conditions, then the obtained results suggest that this effect is caused by $^1O_2$.

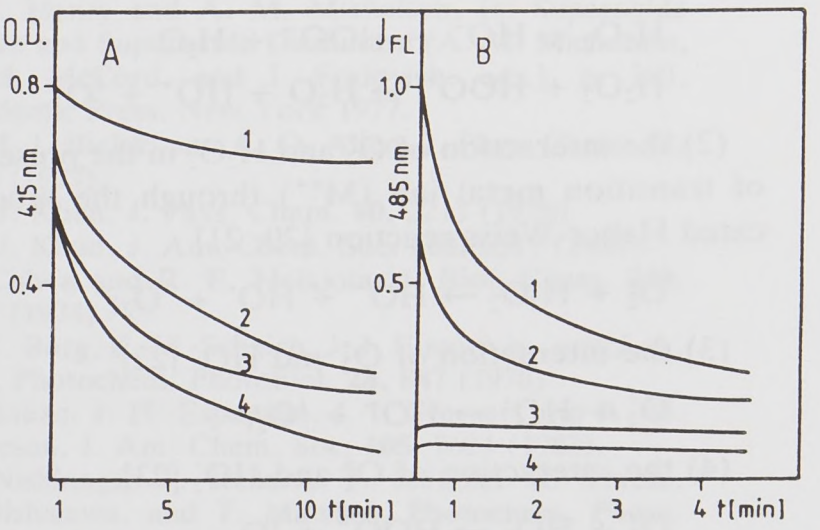


Fig. 3. Changes of absorption (A) and fluorescence (B) intensity during 1,3-diphenylizobenzofurane (DPBF) oxidation in the presence of different substrates combination. Curves: 1-DPBF alone; 2-DPBF + Co^{2+} + H_2O_2; 3-DPBF + Co^{2+} + H_2O_2 + dopamine; 4-DPBF + Co^{2+} + H_2O_2 + dopa. The initial concentrations of DPBF were: 0.1 mM during absorption measurements (A) and 5 μM during kinetics of fluorescence (B). Concentrations of remain substrates: 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O_2, 1 mM dopa and dopamine. All measurements were performed in universal buffer at pH 10.8. Temperature of solutions was 310 K.

Table II. Effect of $^1O_2$-quenchers on chemiluminescence from dopa and dopamine peroxidation. Reaction mixtures contained: 1 mM dopa, 0.5 mM $CoCl_2$, 10 mM H_2O, universal buffer according to Britton pH 11.2. Reaction conditions for the dopamine, were following: 2 mM dopamine, 0.5 mM $CoCl_2$, 20 mM H_2O_2, 0.5 mM KOH.

Quencher was added to the reaction mixture before the addition of H_2O_2. K_q is the total bimolecular rate constant for deactivation of $^1O_2$. Temperature of solutions was 310 K.

Quenchers	Quenching constant $k_q \times 10^{-8}$ [$M^{-1} \cdot s^{-1} \cdot l$]	
	Dopa	Dopamine
Methionine	2.1 ±0.3	4.1 ±0.2
Histidine	2.8 ±0.3	9.3 ±0.3
Sodium azide	0.9 ±0.2	0.5 ±0.1
5,5-dimethylcyclo-hexandione-1.3	1.17 ±0.1	0.9 ±0.2
Biliverdine	10.8 ±1.0	9.1 ±0.3

Discussion

The overall results of this investigation is that $^1O_2$ appear to be produced during dopa and dopamine peroxidation and this species acts as a major emitter of the CL. This conclusion is based on the observation that CL is diminished by the $^1O_2$-quenchers (Table II) and is strongly enhanced in solvents in which $O_2(^1\Delta_g)$ has longer lifetime than in water (Table I, Fig. 1 and Fig. 2). Anterior measurements of fluorescence of catecholamines oxidation products [4, 5] show the emission in the 440–630 nm region, then the fluorescence spectrum does not match the red CL.

The light emission from the present systems was also quenched by free radical inhibitors, such as $O_2^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$ and catalase [4, 5]. The maximum intensity as well as the quantum yield increased rapidly for higher values of H_2O_2 concentrations as well as for higher

values of pH. These results would provide reasonable evidence for the presence of the $^1O_2$.

$^1O_2$ would be formed in these reactions in a secondary order, as a product of the interaction of the various intermediates of oxygen reduction. We list below several hypothetical reactions which can involve $^1O_2$ during the peroxidation of dopa end dopamine.

(1) The base catalyzed disproportionation of H_2O_2 [19]

$$H_2O_2 + HO^- \rightarrow HOO^- + H_2O$$
$$H_2O_2 + HOO^- \rightarrow H_2O + HO^- + {}^1O_2;$$

(2) the interaction of $O_2^{\cdot}$ and H_2O_2 in the presence of transition metal ion (M^{n+}) through the modificated Haber-Weiss reaction [20, 21]

$$O_2^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow HO^- + HO^{\cdot} + {}^1O_2;$$

(3) the interaction of $O_2^{\cdot}$ and $HO^{\cdot}$ [22]

$$O_2^{\cdot} + HO^{\cdot} \rightarrow HO^- + {}^1O_2;$$

(4) the interaction of $O_2^{\cdot}$ and $HO_2^{\cdot}$ [23]

$$O_2^{\cdot} + HO_2^{\cdot} \rightarrow HOO^- + {}^1O_2;$$

(5) the spontaneous and catalyzed disproportionation of $O_2^{\cdot}$ [24, 25]

$$O_2^{\cdot} + O_2^{\cdot} \xrightarrow{+2H^+} H_2O_2 + {}^1O_2.$$

The formation of the abovely indicated oxygen species (HOO^-, $O_2^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$) during polyphenols oxidation is well established [26, 27]. It is known that when the light emission from a chemical reaction is induced by $O_2^{\cdot}$ and H_2O_2 the inhibition of CL by superoxide dismutase, catalase and $HO^{\cdot}$-inhibitors as well as its stimulation by H_2O_2 has been observed.

In our experiments there are two independent possibilities for the generation of the HOO^- ions, namely, the decomposition of the H_2O_2 molecules [19, 28],

$$H_2O_2 + Co(II) \rightarrow Co(III) + HO^- + HO^{\cdot}$$
$$Co(III) + H_2O_2 \rightarrow Co(II)OOH^- + H^+$$

and a sequence of the following reactions [29]:

$$Co(II) + O_2 \rightarrow Co(III)O_2^{\cdot}$$
$$Co(III)O_2^{\cdot} + ArOH \rightarrow Co(III)OOH^- + ArO^{\cdot}$$
$$Co(III)OOH^- \rightarrow Co(II) + HOO^{\cdot}$$

where Co denotes cobalt ion, ArOH = dopa or dopamine.

The finding of this work seems to support the idea that there exists the involvement of $^1O_2$ in this emission. One can expect that the same mechanism takes place *in vivo* on nonenzymatic pathway of catecholamines metabolism.

Some doubt may arise from the fact that not all criteria for the presence of $^1O_2$ were applied to the investigated systems. The detection of $^1O_2$ production by observation of monomol CL at 1268 nm and by the ESR which rely on the generation of stable nitroxide radicals upon reaction of $^1O_2$ with sterically hindered amines provide further proofs of this [30, 31]. These techniques are very sensitive tests for $^1O_2$ production especially in biochemical systems. Infrared CL around 1268 nm provides unambiqueous identification of $^1O_2$ because of the absence of interference from other CL emitters generated in biological oxidation reactions. In spite of the fact that our model systems are very simple in comparison to biochemical ones, the detection of $^1O_2$ by the ESR is actually under study, and measurements of CL at 1268 nm is being planned.

[1] D. Sławińska, Photochem. Photobiol. **28,** 453 (1978).
[2] I. Kruk, T. Michalska, and D. Gołębiowska, Bulletin de Liaison No. 8 du Groupe Polyphenols Narbonne, France, Compte-Rendu des Journées Internationales d'Étude et de l'Assemblée Générale 1978, Nancy, 17–19 Mai, 315–326.
[3] D. Sławińska and J. Sławiński, Post. Fiz. Med. **2,** 121 (1986).
[4] I. Kruk, The generation of toxic oxygen radicals and electronical excited products in oxidation reactions of catecholamines, Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej No. 260, Szczecin 1984 (Polish).
[5] I. Kruk, T. Michalska, K. Lichszteld, and M. Bounias, Z. phys. Chemie, Leipzig (submitted for publication).
[6] M. Bounias, Archs. Int. Physiol. Biochim. **88,** 93 (1980).
[7] M. Bounias and I. Kruk, Comp. Biochem. Physiol. **74c,** 143 (1981).
[8] J. Stauff and H. Schmidkunz, Z. Phys. Chem. N.F. **36,** 61 (1963).
[9] R. F. Wassilev, Bioluminescence (Russ.), pp. 170–176, Nauka, Moscov 1965.
[10] D. R. Kearns, Singlet Oxygen, Academic Press, Inc. 1979, pp. 115–137.
[11] M. A. J. Rodgers, J. Am. Chem. Soc. **105,** 6201 (1983).
[12] R. H. Young, D. Brewer, and R. A. Keller, J. Am. Chem. Soc. **95,** 375 (1973).
[13] D. Belus, Singlet Oxygen (B. Rånby and J. F. Rabek, eds.), pp. 61–110, John Wiley and Sons, 1978.
[14] A. A. Krasnovsky jr., Wozbuzhdennye molekuly (Russ.), pp. 32–50, Nauka, Leningrad 1982.
[15] K. Lichszteld and I. Kruk, Prace Naukowe Politechniki Szczecińskiej No. 116, pp. 53–58, Szczecin 1979.
[16] L. Nassi and G. Cilento, Photochem. Photobiol. **37,** 233 (1983).
[17] R. H. Young, K. Wehrly, and R. L. Martin, J. Am. Chem. Soc. **93,** 5774 (1971).
[18] K. Lichszteld, I. Kruk, and T. Michalska, Z. phys. Chemie, Leipzig **260,** 371 (1979).
[19] L. L. Smith and M. J. Kulig, J. Am. Chem. Soc. **98,** February 4, 1976.
[20] F. Haber and J. Weiss, Proc. R. Soc. Lond. A **147,** 332 (1934).
[21] E. W. Kellogg and I. Fridovich, J. Biol. Chem. **250,** 8812 (1975).
[22] J. P. Henry and A. M. Michelson, in: Superoxide Anion and Superoxide Dismutase (A. M. Michelson, J. M. McCord, and I. Fridovich, eds.), p. 283, Academic Press, New York 1977.
[23] B. M. J. Bielski and A. O. Allen, J. Phys. Chem. **81,** 1048 (1977).
[24] A. U. Khan, J. Phys. Chem. **80,** 2213 (1976).
[25] A. U. Khan, J. Am. Chem. Soc. **103,** 6517 (1981).
[26] G. Cohen and R. E. Heikkila, J. Biol. Chem. **249,** 2447 (1974).
[27] D. C. Borg, K. M. Schaich, J. J. Elmore jr., and J. A. Bell, Photochem. Photobiol. **28,** 887 (1978).
[28] A. Bakac, J. H. Espenson, I. I. Creaser, and A. M. Sargeson, J. Am. Chem. Soc. **105,** 7624 (1983).
[29] A. Nishinaga, T. Itahara, T. Shimzu, H. Tomta, K. Nishizawa, and T. Matsura, Photochem. Photobiol. **28,** 687 (1978).
[30] J. R. Kanofsky, Photochem. Photobiol. **47,** 605 (1988).
[31] E. Cadenas and H. Sies, Methods Enzymol. **105,** 221 (1984).

IV Enzymologie

IV-1 - Collaboration avec la Grande Bretagne

Analyse des paramètres cinétiques par compétition de substrat : application aux phosphatases végétales -

Dr. M.R.J. Morgan et M. Bounias

La difficulté d'analyser l'interaction de nombreuses enzymes avec leurs substrats naturels peut être partiellement contournée grâce à l'utilisation de substrats chromogènes artificiels comme compétiteurs -

Il est alors possible de déterminer les constantes de dissociation et les coefficients de Hill.

La luzerne sauvage, Medicago minima, a été étudiée comme indicateur potentiel d'écotoxicologie -

Ce travail fait suite aux deux derniers stages sabbatiques du Dr Morgan au Laboratoire -

6

17

C. R. Soc. Biol., 1989, *183*, 208-215.

Biochimie végétale.

Propriétés des phosphatases foliaires neutres de la luzerne sauvage, *Medicago minima*.

I. Paramètres cinétiques et leur variabilité naturelle

par M. R. J. MORGAN * et M. BOUNIAS **

* *Molecular Enzymology Laboratory, University of Lancaster, Bailrigg, Lancaster LA1 4YQ, England,*
** *Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, B. P. 91, 84140 Montfavet, France.*

(reçue le 22 septembre 1989).

Summary. — The neutral foliar phosphatases of *Medicago minima* have been studied in samples taken from several locations distributed over a natural biotope, with a view to defining potential ecotoxicological indices. The parameters measured at pH 7.1 (close to intracellular conditions) proved to be statistically homogeneous. The Hill coefficients were less than 1 ($n = 0.65 \pm 0.11$) and numerically equal to the ratio between the partial order with respect to substrate and the partial order with respect to enzyme indicating the presence of functional complexes formed by the reversible aggregation of active subunits. Inorganic phosphate is an inhibitor with strictly competitive kinetics, attaching to the free enzyme with the same Hill coefficient as the substrate, its binding constant ($K_i = 1.28$ mM) is lower than that of the substrate ($K_s = 2.87$ mM). These results make it apparent that the properties of the neutral foliar phosphatases of this plant are sufficiently homogeneous to serve as potential indices of the possible actions of xenobiotics.

Résumé. — Les phophastases foliaires neutres de *Medicago minima* ont été étudiées à partir de prélèvements effectués sur plusieurs stations réparties sur un biotope naturel, en vue de la définition d'indices écotoxicologiques potentiels. Les paramètres mesurés à pH 7,1 proche des conditions intracellulaires, se sont avérés statistiquement homogènes. Les coefficients de Hill sont inférieurs à 1 ($n = 0,65$) et numériquement égaux au rapport de l'ordre partiel du substrat sur l'ordre partiel de l'enzyme, ce qui indique la présence de complexes fonctionnels formés par l'agrégation réversible de sous-unités actives. Le phosphate est un inhibiteur compétitif strict, qui se fixe sur l'enzyme libre avec le même coefficient de Hill que le substrat. Sa constante ($K_i = 1,28$ mM) est inférieure à celle du substrat ($K_s = 2,87$ mM). Ces résultats font apparaître les propriétés des phosphatases foliaires neutres de la plante comme suffisamment homogènes pour constituer autant d'indices potentiels de l'action éventuelle de xénobiotiques.

Les phosphatases constituent l'une des clés de voûte du métabolisme de l'ensemble des êtres vivants. A leurs fonctions vis-à-vis des substrats tels que ceux de la glycolyse (1) s'ajoute leur rôle dans la déphosphorylation des protéines (2, 3) dont dépend la régulation de nombreuses interactions entre ligands et récepteurs (4). Les variations de leur activité représentent donc, potentiellement, un important indice biochimique susceptible de revêtir une valeur sémiologique (5, 6).

Dans le but d'explorer les possibilités de leur utilisation dans l'étude des atteintes portées à l'environnement végétal par des xénobiotiques toxiques, nous avons analysé les variations des propriétés cinétiques de l'activité phosphatasique neutre dans les feuilles de la luzerne sauvage, *Medicago minima*, provenant de plusieurs stations situées sur un même biotope du sud de la France.

Matériel végétal et techniques. — Les plants de *Medicago minima* ont été prélevés avec leur motte de terre sur 5 stations situées à intervalles de 3 m le long d'un axe de 15 m de longueur, et ramenés immédiatement au laboratoire. Des échantillons de 100 mg de poids frais ont été pesés et broyés dans des homogénéiseurs de Potter en présence de 500 µl d'eau. Le surnageant récupéré après 15 mn de centrifugation à 5 000 *g* est directement utilisé pour les analyses enzymatiques. Les cinétiques sont tracées par l'enregistrement en continu à 410 nm de la coloration du para-nitro-phénol libéré par l'hydrolyse du para-nitro-phényl-phosphate (pNPP), dans un photomètre Vernon PHI5. La concentration finale de l'extrait correspond à 1 mg de feuilles fraîches pour 100 mg de milieu réactionnel contenant 20 mM de phloroglucinol, qui inhibe les réactions parasites dues à la mélanisation des dérivés des acides hydroxycinnamiques. Le choix d'un pH neutre (tampon Tris HCL pH 7,1 $\pm$ 0,1, 50 mM final) a été dicté par le souci de respecter des conditions moyennes proches de celles de l'activité intracellulaire.

Les paramètres cinétiques ont été calculés d'après les méthodes algébriques générales établies pour les paramètres non-michaeliens (7, 8). Les ordres partiels apparents de la réaction, vis-à-vis de l'enzyme et du substrat ont été calculés comme indiqué précédemment (9). Les probabilités associées aux comparaisons de moyennes et de variances ont été calculées respectivement d'après les équations de distribution de « t » et de « F ».

Résultats. — Le tableau I présente les valeurs obtenues pour 5 répétitions sur chacune des 5 stations. L'analyse de variance montre une très bonne stabilité des trois paramètres cinétiques, dont la variabilité est caractérisée par les seuils de risque suivant : V_M ($P = 0{,}99991$); K_s($P = 0{,}9974$); n($P = 0{,}9998$).

La figure 1 présente la courbe d'Arrhénius : $L_n\, v = -E/RT + L_n\, A$ obtenue à partir d'une série de mesures de la vitesse de réaction en pré-

TABLEAU I. — Variabilité des paramètres cinétiques des phosphatases foliaires neutres de plants de *Medicago minima* provenant de 5 stations différentes.

Stations :	1	2	3	4	5
V_M	46,4	36,5	47,3	48,5	48,7
(μM/mn/μl)	43,3	39,3	42,8	45,9	59,9
	43,7	36,8	37,5	49,0	61,5
	30,2	30,0	45,7	44,0	65,5
	32,4	46,2	48,3	53,2	56,0
$\bar{x}$	39,2	37,8	44,3	48,1	58,3
(σ)	(7,35)	(5,84)	(4,34)	(3,49)	(6,37)
K_M	3,38	3,24	2,46	3,47	2,00
(mM)	1,81	3,57	2,13	3,23	2,69
	2,05	3,28	1,74	3,52	2,79
	3,09	2,80	2,34	3,05	2,68
	3,12	4,85	2,54	3,90	2,15
$\bar{x}$	2,69	3,55	2,24	3,43	2,46
(σ)	(0,71)	(0,78)	(0,32)	(0,32)	(0,36)
n	0,53	0,48	0,77	0,66	0,87
	0,71	0,46	0,64	0,67	0,65
	0,66	0,48	0,95	0,63	0,59
	0,56	0,55	0,84	0,70	0,71
	0,55	0,46	0,74	0,61	0,79
$\bar{x}$	0,60	0,49	0,79	0,65	0,72
(σ)	(0,078)	(0,037)	(0,115)	(0,035)	(0,110)

Les écarts types (σ) sont donnés entre parenthèses pour chaque moyenne partielle ($\bar{x}$).

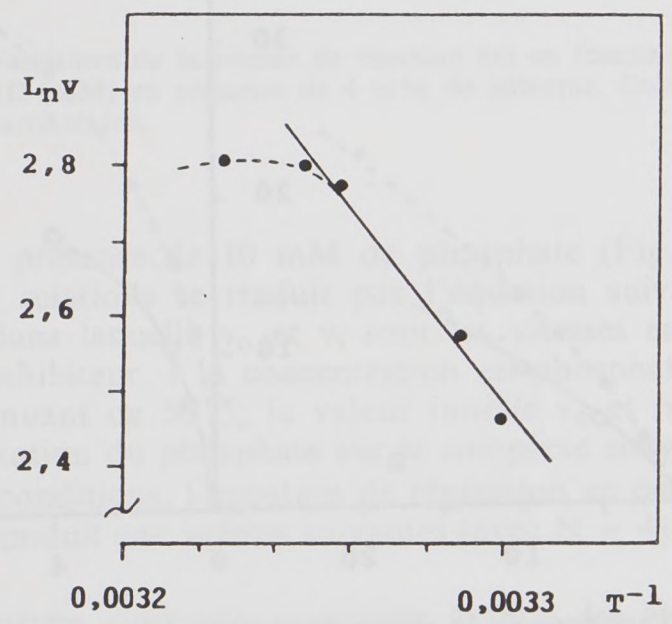


FIG. 1. — Courbe d'Arrhénius caractéristique de l'activation thermique des phosphatases foliaires neutres de *Medicago minima*.

sence de 1 mM de substrat entre les températures de 30° C et 36° C. Le calcul de régression effectuée sur la partie linéaire de la courbe conduit aux paramètres suivants : $\rho = -0{,}990$ ($N = 4$ paires) et $b = -6331{,}3$ soit $E = 52{,}7\ KJ.mol^{-1}$.

Les valeurs du coefficient de Hill sont constamment inférieures à l'unité, ce qui concorde avec des conditions dans lesquelles plusieurs formes moléculaires d'enzyme concourent à hydrolyser le même substrat. Dans l'hypothèse où ces différentes formes pourraient être considérées comme des modes particuliers d'agrégation en plus ou moins grand nombre d'un protomère enzymatique, comme le suggèrent par exemple, les travaux de Sykes et coll. (10), le coefficient de Hill pourrait être assimilable au quotient de l'ordre partiel du substrat sur l'ordre partiel de l'enzyme, calculés selon les relations cinétiques chimiques classiques à partir de la réaction suivante (9) :

$$n_E\ E + n_s\ S \rightleftharpoons (ES)_n \rightarrow P$$

où n_E est le nombre de protomères enzymatiques et n_s le nombre de molécules de substrat associés en complexes fonctionnels. Les mesures effectuées à partir des variations respectives de la vitesse de réaction en fonction des concentrations de l'enzyme et du substrat (Fig. 2) exprimées en coordonnées logarithmiques, ont permis de dégager les valeurs suivantes, à partir des échantillons 1 et 5 : $n_s = 0{,}485 \pm 0{,}037$ et

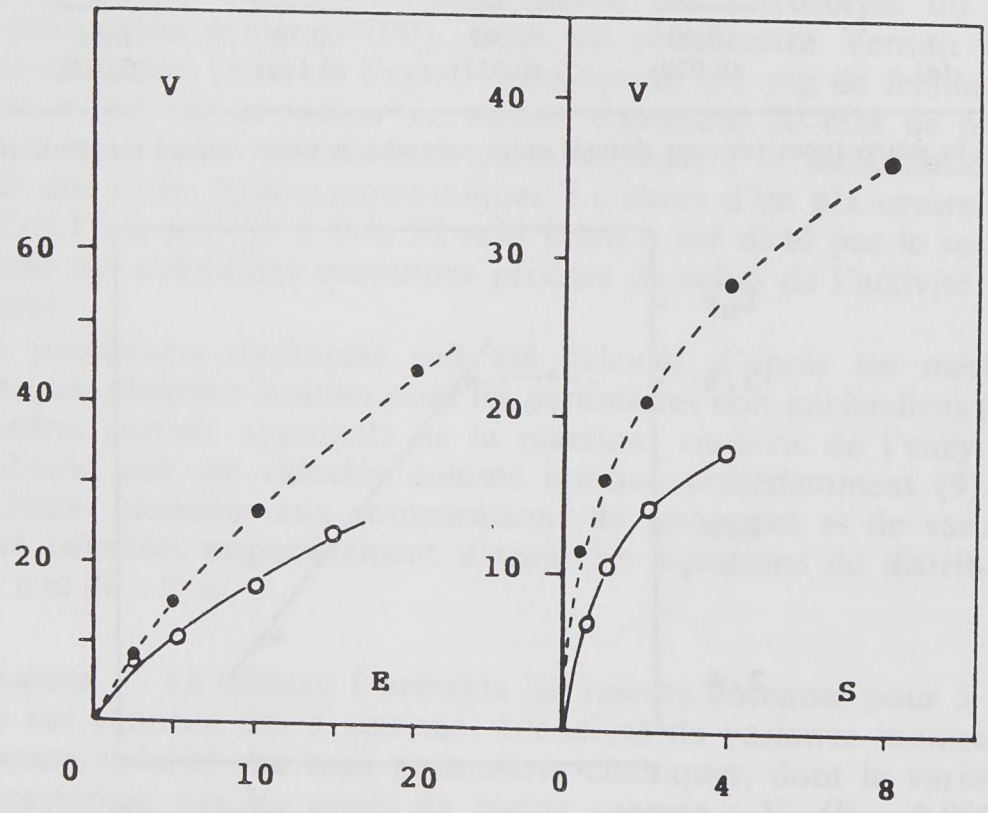


FIG. 2. — Variations de la vitesse de réaction (v) en fonction des concentrations en extrait enzymatique (E) (µl) et en substrat (S) (mM) pour les échantillons n° 1 (—o—) et 5 (...● ...).

$n_E = 0{,}725 \pm 0{,}059$, soit un rapport $n_s/n_E = 0{,}669 \pm 0{,}054$. Pour les mêmes échantillons, le coefficient de Hill moyen a été de $0{,}662 \pm 0{,}060$, soit une valeur non significativement différente de la précédente.

Les phosphatases ont pour caractéristique d'être inhibées par l'ion phosphate produit par la réaction (11). Nous avons donc cherché à caractériser également l'activité de nos extraits, dans les conditions expérimentales décrites, en mesurant les variations de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en phosphate, en présence de 4 mM de substrat (Fig. 3) et en fonction de la concentration en

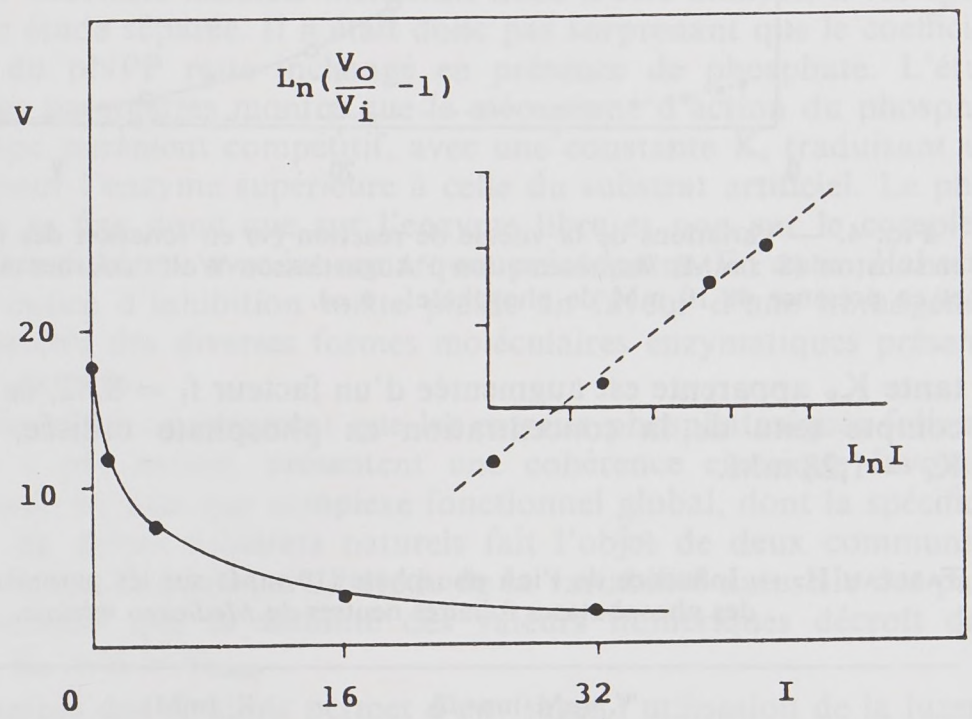


FIG. 3. — Variations de la vitesse de réaction (v) en fonction des concentrations en phosphate (I) (mM) en présence de 4 mM de substrat. Courbe directe et représentation bilogarithmique.

substrat, en présence de 10 mM de phosphate (Fig. 4). La première de ces deux relations se traduit par l'équation suivante : $(v_0/v_i) - 1 = (I/I_{50})^{ni}$ dans laquelle v_0 et v_i sont les vitesses en l'absence et en présence d'inhibiteur, I la concentration en phosphate, I_{50} la concentration diminuant de 50 % la valeur initiale v_0 et n_i le coefficient de Hill de la fixation du phosphate sur le complexe enzymatique.

Dans ces conditions, l'équation de régression en coordonnées bilogarithmiques conduit aux valeurs suivantes (avec $N = 4$) : $I_{50} = 2{,}44$ mM et $n_i = 0{,}79$.

Les paramètres cinétiques comparés à ceux des témoins correspondants sont présentés dans le tableau II. Ni la vitesse maximale, ni le coefficient de Hill ne sont significativement affectés. La constante résul-

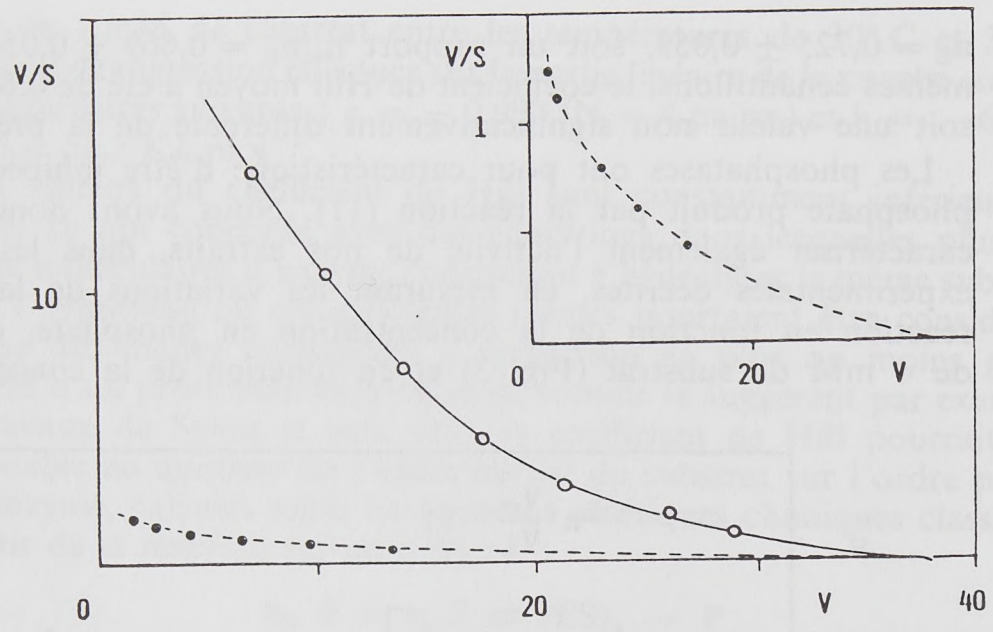


FIG. 4. — Variations de la vitesse de réaction (v) en fonction des concentrations en substrat (S : mM). Représentation d'Augustinsson-Wolf : courbes témoins (—o—) et en présence de 10 mM de phosphate(...● ...).

tante K_R apparente est augmentée d'un facteur $f_i = 8,82$, ce qui permet, compte tenu de la concentration en phosphate utilisée, de calculer $K_i = 1,28$ mM.

TABLEAU II. — Influence de l'ion phosphate (10 mM) sur les paramètres cinétiques des phosphatases foliaires neutres de *Medicago minima*.

	V_M (μM/mn/μl)	K_m (mM)	n
Témoins	37,6 ± 7,6	2,55 ± 0,66	0,67 ± 0,14
Phosphate	36,9 ± 10,4	22,5 ± 1,8	0,77 ± 0,01
Comparaison	NS	$P < 0,001$	NS
f_i	—	8,82	—
f'_i	1,02	—	—

NS = non statistiquement significatif.

Les moyennes et les écarts-types sont donnés pour 5 mesures.

Discussion et conclusions. — Les phosphatases foliaires neutres de *Medicago minima* présentent une valeur tout à fait normale de la constante d'Arrhénius. En revanche, les coefficients de Hill sont situés parmi les faibles valeurs rencontrées chez les enzymes, en général, mais ne sont pas inhabituelles dans le cas de cette classe d'enzymes (12) fréquemment caractérisée par une coopérativité négative. La remarquable identité des valeurs du coefficient de Hill avec celles du quotient des ordres partiels du substrat et de l'enzyme permet de formuler l'hypo-

thèse de la formation de complexes fonctionnels réversiblement constitués à partir de sous-unités. De tels mécanismes ont déjà été décrits chez d'autres organismes et peuvent même se traduire par l'apparition de formes moléculaires variables (13). Dans ce cas, l'ordre partiel n_E s'applique à un protomère hypothétique dont les propriétés seraient représentatives de la moyenne des valeurs mesurables pour les diverses sous-unités en présence.

Il est intéressant d'observer que l'ion phosphate libre présente le même coefficient de Hill que le substrat, ce qui reflète la spécificité primaire de l'enzyme vis-à-vis du radical phosphate du paranitrophénylphosphate (pNPP). Le comportement de l'enzyme vis-à-vis de divers substrats naturels mériterait donc d'être analysé, à cet égard, dans une étude séparée. Il n'était donc pas surprenant que le coefficient de Hill du pNPP reste inchangé en présence de phosphate. L'étude des autres paramètres montre que le mécanisme d'action du phosphate est de type purement compétitif, avec une constante K_i traduisant une affinité pour l'enzyme supérieure à celle du substrat artificiel. Le phosphate ne se fixe donc que sur l'enzyme libre et non sur le complexe, ce qui reste cohérent avec les remarques précédentes. En outre, l'absence de tout indice d'inhibition mixte plaide en faveur d'une homogénéité des propriétés des diverses formes moléculaires enzymatiques présentes dans les extraits.

Ces observations montrent que les extraits phosphatasiques foliaires, analysés à pH neutre, présentent une cohérence cinétique favorable à leur étude en tant que complexe fonctionnel global, dont la spécificité vis-à-vis de divers substrats naturels fait l'objet de deux communications séparées. D'autre part, l'étude de la variabilité naturelle des paramètres montre que la stabilité des valeurs numériques décroît dans l'ordre : $K_s > n > V_{max}$.

L'ensemble des résultats permet d'envisager l'utilisation de la luzerne sauvage, *Medicago minima*, très commune dans les biotopes naturels du sud de la France et des pays méditerranéens, comme un bon indice potentiel pour des études d'écotoxicologie moléculaire (*).

(*) Le Dr Morgan exprime ses remerciements à B. D. H., I. C. I., I. N. R. A., Rhône-Poulenc, La Royal Society et Sigma Chimie pour leur soutien financier. Les auteurs remercient Mme Daurade pour sa participation à la préparation des expérimentations et Mme Bareste pour la préparation matérielle du texte.

Bibliographie

1. Turner J. F. & Turner D. H., *In:* The Biochemistry of Plants, volume 2 : Metabolism and Respiration (Ed. D. D. Davies), *Acad. Press*, 1980, 279-316.
2. Robinson D. B. & Glew R. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, *210*, 186-199.
3. Swarup G., Cohen S. & Garbers D. L., *J. Biol. Chem.*, 1981, *256*, 8197-8201.
4. Cohen P., *Annu. Rev. Biochem.*, 1989, *58*, 453-508.
5. Okubo A., *Taisha*, 1976, *13*, 285-292.

24

6. Stepan J. & Vecerek B., *Acta Univ. Carol., Med., Monogr.*, 1977, *77*, 135-140.
7. Bounias M., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, *63B*, 407-417.
8. Bounias M., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1989, *3*, 1-9.
9. Bounias M., *C. R. Acad. Sc.*, 1983, *297*, *III*, 583-588.
10. Sykes E., Kiechle F. L. & Epstein E., *Clin. Biochem.*, 1987, *20*, 259-263.
11. Stadtman T. C. *In:* The Enzymes (Boyer, Lardy and Myrback Ed.), 1961, *5*, 55,
12. Ladzunski M., Petitclerc C., Chappelet D. & Ladzunski C., *Eur. J. Biochem.*, 1971, *20*, 124-139.
13. Cocivera M., Mc Manaman J. & Wilson I. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980. *200*, 396-400.

p. 25-31 | K L N U W Z Y E V R T P * | AD/FGo 13ref | S | no. 10414

Medicago / feuille / estérase // activité enzymatique / plante sauvage

[Properties of the neutral foliar properties of the wild lucerne, Medicago minima. 2. Comparison of Hill coefficients of five natural phosphorylated esters

25

C. R. Soc. Biol., 1989, *183*, 314-320.

Biochimie végétale.

Propriétés des phosphatases foliaires neutres de la luzerne sauvage *Medicago minima*. II. Comparaison des coefficients de Hill de cinq esters phosphoriques naturels

par M. BOUNIAS * et M. R. J. MORGAN **

* *Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, B. P. 91, 84143 Montfavet Cedex.*
** *Molecular Enzymology Laboratory, University of Lancaster, Bailrigg, Lancaster LA1, 4YQ, England.*

(reçue le 22 septembre 1989).

Summary. — The Hill coefficients (n_L) characteristic of the interaction of five natural phosphorylated substrates with the neutral foliar phosphatases of *Medicago minima* were determined by analysis of the kinetic parameters resulting from their competitive effect on the rate of hydrolysis of paranitrophenyl phosphate (pNPP). The coefficient is less than unity (0.50, 0.77, 0.78 respectively) in the cases of glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate and fructose-1,6-bisphosphate; slightly greater than one in the case of fructose-6-phosphate; and equal to one for glycerol-2-phosphate. On the other hand, the concentration of natural phosphorylated substrate required to halve the rate of hydrolysis of pNPP is substantially identical in each case (L_{50} = 30.7 ± 3.0 mM). The method of analysis by substrate competition therefore allows the calculation of two parameters capable of serving as useful indices in the search for ecotoxicological symptoms in a natural biotope.

Résumé. — Les coefficients de Hill (n_L) caractéristiques de l'interaction de cinq substrats phosphorylés naturels différents avec les phosphatases foliaires neutres de *Medicago minima* ont été déterminés par analyse des paramètres cinétiques résultant de leur compétition avec la vitesse d'hydrolyse du para-nitro-phényl-phosphate (pNPP). Ce coefficient est inférieur à l'unité (respectivement : 0,50; 0,77; 0,78) dans le cas du glucose-1 ou 6-phosphate et du fructose-1,6-di-phosphate. Il est légèrement supérieur à 1 dans le cas du fructose-6-phosphate et égal à 1 pour le glycérol-2-phosphate. En revanche, la concentration de substrat naturel phosphorylé, qui diminue de moitié la vitesse d'hydrolyse du pNPP pur, est sensiblement identique dans tous les cas (L_{05} = 30,7 ± 3,0 mM).

Le procédé d'analyse par compétition de substrats permet donc le calcul de deux paramètres susceptibles de constituer des indices utiles dans la recherche de symptômes écotoxicologiques dans un biotope naturel.

Les phosphatases se présentent souvent, chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes, sous la forme de complexes constitués de plusieurs sous-unités agglomérées entre elles (1) ou à d'autres structures moléculaires (2). La dissociation et la réassociation des sous-unités peut conduire à l'apparition de formes moléculaires particulières, parfois considérées comme des isoenzymes (3) malgré la prudence que doit inspirer, à cet égard, l'observation de variants électrophorétiques.

Compte tenu de telles particularités, il n'est pas surprenant que les mesures cinétiques aient fait apparaître des propriétés de coopérativité apparente, par exemple positives chez les phosphoprotéines-phosphatases de la rate humaine (4) ou les feuilles d'Orge (5) et négatives dans l'intestin de l'Abeille (6) ou dans des feuilles de luzerne sauvage (7).

En effet, dans l'hypothèse d'un complexe moléculaire fonctionnel dans lequel un nombre n_E de protomères enzymatiques s'associent réversiblement pour fixer un nombre n_s de molécules de substrat, et les transformer en produits, la cinétique se traduit par une coopérativité apparente dans laquelle le coefficient de Hill est analogue au rapport n/n_E (8). Tel était le cas pour l'activité des phosphatases foliaires de la luzerne sauvage, *Medicago minima*, à pH neutre, choisi pour refléter les conditions intra-cellulaires moyennes, que nous avons envisagé d'utiliser comme indice de détection de symptômes écotoxicologiques (7). L'étude précédente a été réalisée avec le para-nitrophényl-phosphate (pNPP), comme substrat chromogène, dont le mécanisme réactionnel, au cours de l'hydrolyse a été bien établi (9). Toutefois, en raison de l'importance que peut revêtir le substrat dans l'expression de la coopérativité (4), il nous a paru utile d'analyser comparativement les coefficients de Hill de plusieurs substrats phosphorylés naturels.

Matériel végétal et méthodes. — Les extraits de feuilles de *Medicago minima* provenant de plants prélevés sur un biotope naturel ont été préparés et analysés comme précédemment (7). Les coefficients de Hill ont été calculés à partir des relations exprimant les variations de la vitesse de réaction du pNPP en présence de concentrations croissantes en substrat naturel, agissant comme pseudo-compétiteur :

$$\begin{array}{ccc} E + n_0S & \underset{(K_s)}{\rightleftharpoons} & (ES)_{n_0} \rightarrow Q \\ + n_LL & & \\ \uparrow\downarrow (K_L) & & \\ (EL)_{nL} & \rightarrow P & \end{array}$$

Dans ce schéma, n_0 est le coefficient de Hill du pNPP, n_L celui du substrat naturel L, K_s et K_L sont leurs deux constantes de dissociation respectives, Q est le para-nitrophénol libéré et mesuré, P est le produit non mesuré de l'hydrolyse du substrat naturel. Dans ces conditions, l'équation générale du phénomène est analogue à celle d'une inhibition compétitive, et l'expression de la vitesse résultante v_R s'écrit :

$$v_R = V_M.S^{no}/[K_s(1 + L^{nL}/K_L) + S^{no}] \qquad [1]$$

Si L_{50} est la concentration du substrat naturel compétiteur donnant la vitesse initiale $v_R = v_0/2$, où v_0 est la valeur obtenue avec $L = 0$, l'équation devient :

$$v_0/v_R = 1 + (L/L_{50})^{nL} \qquad [2]$$

soit sous la forme transformée logarithmique :

$$L_n[(v_0/v_R) - 1] = n_L . L_n L - n_L . L_n L_{50} \qquad [3]$$

L'équation [2] reste donc identique à celle établie dans le cas d'une véritable inhibition (10). Le calcul de régression linéaire effectué à partir de l'équation [3] permet de déduire la pente $b = n_L$ et l'abscisse à l'origine $-a/b = L_n L_{50}$ d'où $L_{50} = e^{-a/b}$. La variance de la pente est donnée par $\sigma_{b^2} = [(b/\rho)^2 - b^2]/(N - 2)$ où ρ est le coefficient de corrélation et N le nombre de couples de valeurs (v_{Ri}, L_i).

Les probabilités associées aux comparaisons de moyennes ont été calculées d'après l'équation de distribution de « t » de Student. Les valeurs des vitesses initiales sont la moyenne de 2 à 4 mesures, avec un coefficient de variation compris entre 0,032 et 0,080, soit une variabilité moyenne de ± 5,6 %.

Résultats. — Les figures 1, 2, 3, 4 présentent les données numériques respectivement obtenues en présence de glycérol-2-phosphate, de glucose-1 et 6-phosphate, ainsi que de fructose-6-phosphate et 1,6-diphosphate. Les paramètres de régression obtenus à partir des représentations bi-logarithmiques, ainsi que les valeurs de L_{50} qui en découlent, sont indiqués dans le tableau I.

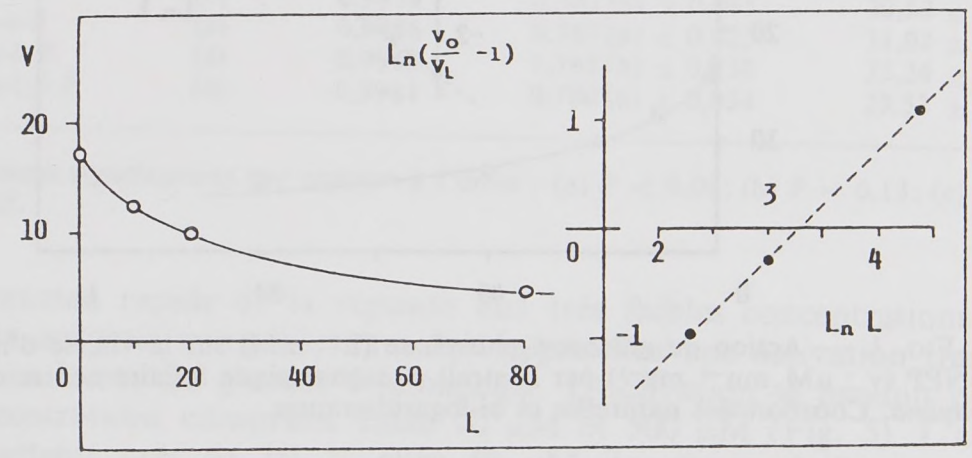


FIG. 1. — Action du glycérol-2-phosphate (L : mM) sur la vitesse d'hydrolyse du pNPP (v : $\mu M . mn^{-1} . mg^{-1}$) par l'extrait phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima*. Coordonnées naturelles, et représentation bi-logarithmique.

Les valeurs de L_{50} sont remarquablement constantes et ne diffèrent au maximum que de 23 %, entre le glycérol-2-phosphate et le fructose-6-phosphate (non significatif). En revanche, d'importantes différences

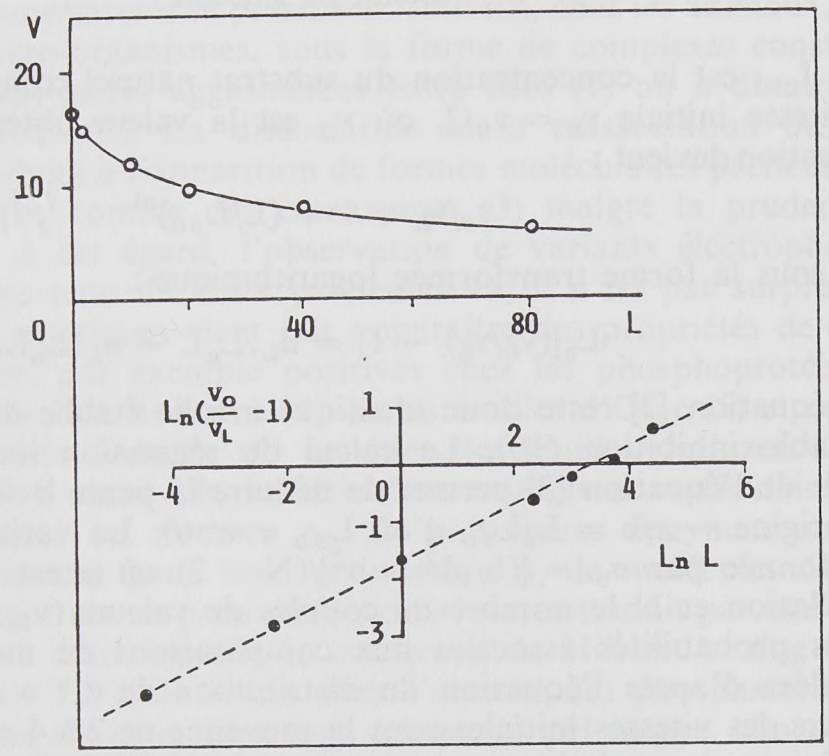


FIG. 2. — Action du glucose-1-phosphate (L : mM) sur la vitesse d'hydrolyse du pNPP (v : $\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$) par l'extrait phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima*. Coordonnées naturelles et bi-logarithmiques.

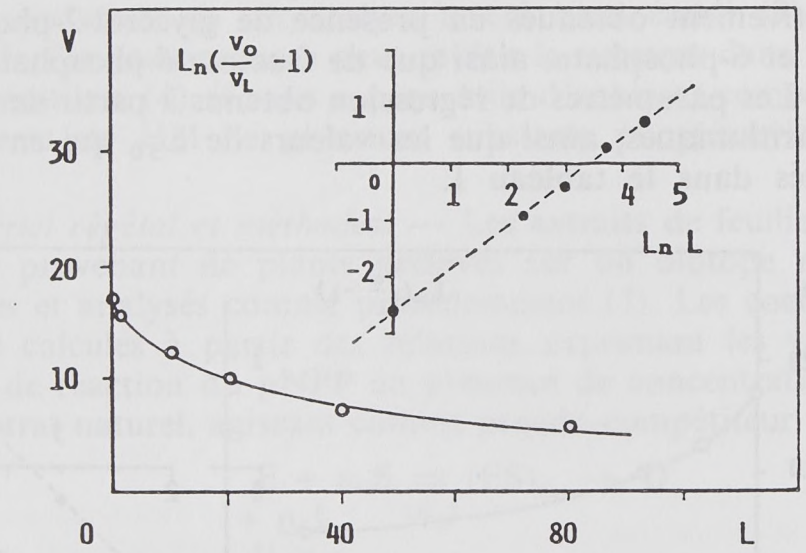


FIG. 3. — Action du glucose-6-phosphate (L : mM) sur la vitesse d'hydrolyse du pNPP (v : $\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$) par l'extrait phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima*. Coordonnées naturelles et bi-logarithmiques.

apparaissent au niveau des coefficients de Hill respectifs des divers substrats. Le glycérol-2-phosphate présente un coefficient strictement michaëlien. Celui du fructose-6-phosphate est supérieur à l'unité, mais de manière peu significative. Enfin, les glucoses-1 et 6-phosphate ainsi que le fructose-1,6-diphosphate présentent des coefficients significativement inférieurs à l'unité.

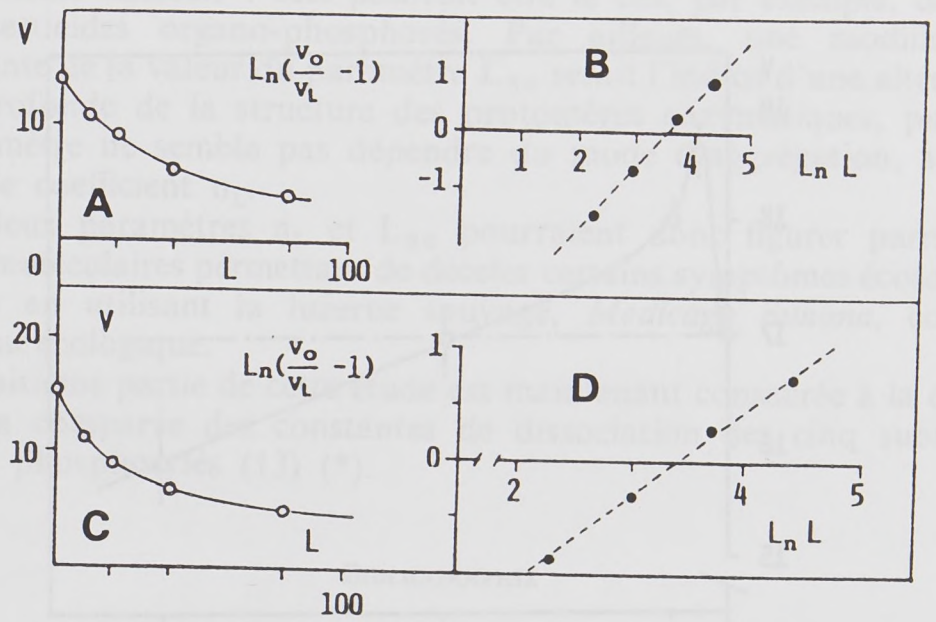


FIG. 4. — Action du fructose-6-phosphate et 1,6-diphosphate (L : mM) sur la vitesse de l'hydrolyse du pNPP (v : $\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$) par l'extrait phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima*. Coordonnées naturelles : (A) Fru-6-P; (C) Fru-1,6-P.Coordonnées bi-logarithmiques : (B) Fru-6-P; (D) Fru 1,6-P.

TABLEAU I. — Paramètres calculés à partir des représentations bi-logarithmiques des résultats expérimentaux, d'après l'équation [3].

Substrats	(N)	ρ	n_L	L_{50} (mM)
Glycérol-2-P	(3)	0,9999	0,984 (c) ± 0,014	26,94 ± 8,98
Glucose-1-P	(7)	0,9978	0,503 (a) ± 0,015	30,63 ± 1,05
Glucose-6-P	(5)	0,9986	0,767 (a) ± 0,023	31,07 ± 1,24
Fructose-6-P	(4)	0,9965	1,165 (b) ± 0,138	35,24 ± 2,48
Fructose-1,6-P	(4)	0,9981	0,780 (a) ± 0,034	29,53 ± 2,48

Différences significatives par rapport à l'unité : (a) $P < 0,01$; (b) $P = 0,13$; (c) non significatif.

Un examen rapide de la réponse aux très faibles concentrations en substrats naturels compétiteurs a fait apparaître une activation transitoire dans le cas du glucose-6-phosphate. L'activation se produit pour les concentrations comprises entre 10 μM et 500 μM (Fig. 5). L'activation atteint près de 10 % avec 50 μM de glucose-6-phosphate.

Discussion et conclusions. — Le procédé d'analyse par compétition de substrats permet d'accéder à la détermination du coefficient de Hill d'un ligand dont la transformation n'est pas mesurée directement. Les résultats obtenus sont compatibles avec l'hypothèse d'une modification des fonctionnements des complexes enzymatiques en fonction

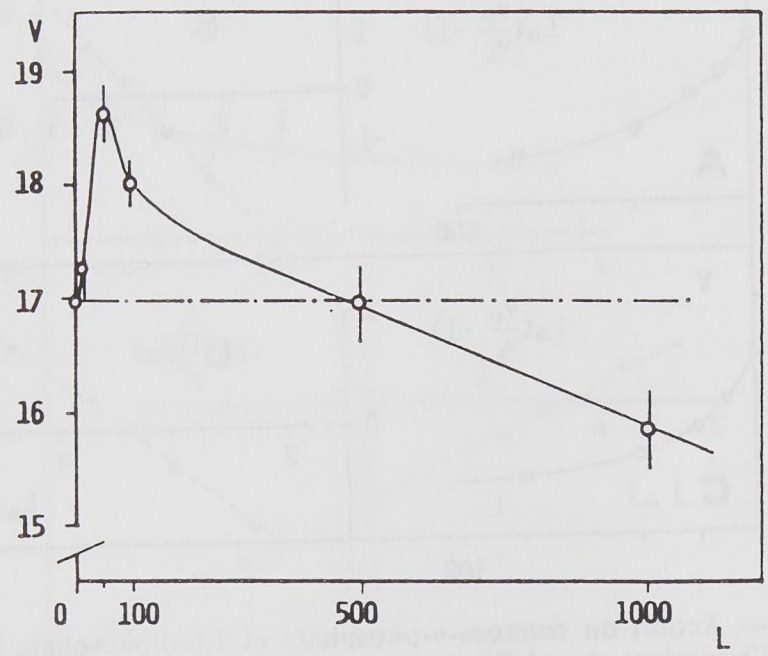


FIG. 5. — Activation de la cinétique pNP-phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima* par de faibles concentrations en glucose-6-phosphate. Les vitesses v sont exprimées en $\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$ et les concentrations en Glc-6-P (L) en μM. Les écarts types sont donnés pour 3 déterminations.

de la nature des substrats, comme cela a été montré pour les α-glucosidases de l'Abeille (11).

Le coefficient de Hill du glucose-1-phosphate est significativement abaissé ($P < 0,02$) par rapport à celui du glucose-6-phosphate. La position de la liaison ester phosphorique sur le carbone 1, voisin de l'atome d'oxygène du cycle, pourrait être impliquée dans ce phénomène puisque l'adjonction d'une liaison phosphorique en position 1 sur le fructose-6-phosphate diminue également le coefficient de Hill de manière significative ($P < 0,01$).

Il est intéressant de constater que, malgré ces différences, la concentration en substrat naturel phosphorylé qui réduit de moitié la vitesse initiale mesurée avec le seuil pNPP est pratiquement constante, autour d'une valeur moyenne $L_{50} = 30,7 \pm 3,0$ mM.

L'activation de la vitesse d'hydrolyse du pNPP par le glucose-6-phosphate n'est pas sans rappeler celle des phosphatases chloroplastiques de l'épinard par le fructose-diphosphate (12). Le mécanisme, qui devrait impliquer une activation du complexe entre l'enzyme et le pNPP par le substrat naturel compétiteur, fait l'objet de la suite de nos recherches. Il serait donc intéressant d'analyser les modifications éventuelles du spectre des formes moléculaires séparées, par exemple, par filtration sur gel, en présence de concentrations faibles et fortes de plusieurs substrats phosphorylés.

Tout xénobiotique toxique susceptible d'agir sur le mode d'arrangement des complexes phosphatasiques serait donc susceptible de conduire à des modifications décelables du coefficient de Hill du pNPP comme

des substrats naturels : ceci pourrait être le cas, par exemple, de certains pesticides organo-phosphorés. Par ailleurs, une modification importante de la valeur du paramètre L_{50} serait l'indice d'une altération assez profonde de la structure des protomères enzymatiques, puisque ce paramètre ne semble pas dépendre du mode d'aggrégation, auquel est lié le coefficient n_L.

Les deux paramètres n_L et L_{50} pourraient donc figurer parmi les indices moléculaires permettant de déceler certains symptômes écotoxicologiques en utilisant la luzerne sauvage, *Medicago minima*, comme indicateur écologique.

La troisième partie de cette étude est maintenant consacrée à la détermination comparée des constantes de dissociation des cinq substrats naturels phosphorylés (13) (*).

Bibliographie

1. Affoter D., Schurmann P. & Stutz E., *Adv. Photosynth. Res.*, Proc. 6th Internat. Congr., 1983, *3*, 517-520.
2. Sykes E., Kiechle F. & Epstein E., *Clin. Biochem.*, 1987, *20*, 259-263.
3. Cocivera M., Mc Manaman J. & Wilson I. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, *200*, 396-400.
4. Robinson D. B. & Glew R. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, *210*, 186-199.
5. Bounias M. & Pachéco H., *C. R. Acad. Sc.*, 1974, *279D*, 691-694.
6. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1978, *178*, 855-859.
7. Morgan M. R. J. & Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1989, *183*, 208-215.
8. Bounias M., *C. R. Acad. Sc.*, 1983, *297III*, 583-588.
9. Wilson I. B. & Reid T. W., *Biochemistry*, 1971, *10*, 380-387.
10. Chou T. C., *J. Theor. Biol.*, 1976, *59*, 253-276.
11. Bounias M., *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, 1989, sous presse.
12. Gontero B., Meunier J. C. & Ricard J., *Plant Sci. Letters*, 1984, *36*, 195-199.
13. Morgan M. R. J. & Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1989, *183*, 321-328.

(*) Le Dr Morgan exprime ses remerciements à B. D. H., I. C. I., I. N. R. A. Rhône-Poulenc, La Royal Society et Sigma Chimie pour leur soutien financier. Les auteurs remercient Mme Daurade pour sa participation à la préparation des expérimentations et Mme Bareste pour la préparation matérielle du texte.

32

C. R. Soc. Biol., 1989, *183*, 321-328.

Biochimie végétale.

Propriétés des phosphatases foliaires neutres de la luzerne sauvage *Medicago minima*. III. Détermination du K_s de cinq esters phosphoriques de la glycolyse par compétition de substrats

par M. R. J. MORGAN * et M. BOUNIAS **

* *Molecular Enzymology Laboratory, University of Lancaster, Bailrigg, Lancaster LA1 4YQ, England.*
** *Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, B. P. 91, 84140 Montfavet, France.*

(reçue le 2 octobre 1989).

Summary. — The method of studying kinetics by substrate competition permitted the determination of apparent dissociation constants for five natural phosphorylated substrates by pseudoinhibition of the reaction obtained with para-nitrophenyl phosphate at neutral pH, in the presence of crude extracts prepared from the leaves of the wild lucerne *Medicago minima* derived from a natural biotope. The resultant maximal velocities, measured in the presence of 40 mM concentrations of glycerol-2-phosphate, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate or fructose-1,6-diphosphate, remained unchanged ($V_{MR} = 61.3 \pm 10.7$ $\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$) compared to those of the controls ($V_M = 64.5 \pm 6.6$ $\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$) while the binding constants increased towards a value of 7.9 ± 1.5 mM, except for glucose-1-phosphate ($K_R = 4.2 \pm 0.2$ mM) as against 3.0 ± 0.7 mM for para-nitrophenyl phosphate alone. Values of the constant K_L specific to each ester were situated around a mean of 13.5 ± 3.0 mM, except for glucose-1-phosphate for which $K_L = 30 \pm 7$ mM. The neutral para-nitrophenylphosphatase activity of the leaves of *Medicago minima* could be used for the detection of ecotoxicological symptoms in the natural environment.

Résumé. — La méthode d'étude cinétique par compétition de substrats a permis l'étude des constantes de dissociation apparente de cinq substrats phophorylés naturels, par pseudo-inhibition de la réaction obtenue avec le para-nitrophényl phosphate, en présence d'extraits bruts, à pH neutre, de feuilles de luzerne sauvage *Medicago minima* provenant d'un biotope naturel. Les vitesses maximales résultantes mesurées en présence de 40 mM de glycérol-2 phosphate, de glucose-1 ou 6-phosphate, de fructose 6 phosphate et de fructose-1,6-diphosphate restent inchangées ($V_{MR} = 61,3 \pm 10,7$ $\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$), par rapport à celles des témoins ($V_M = 64,5 \pm 6,6$ $\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$) tandis que les constantes résultantes

s'élèvent vers 7,9 ± 1,5 mM, sauf pour le Glc-1-P (4,2 ± 0,2 mM) contre 3,0 ± 0,7 mM pour le para-nitrophényl phosphate. Les constantes K_L spécifiques de chaque ester se situent autour de la valeur moyenne 13,5 ± 3,0 mM, sauf pour le Glc-1-P, moins actif, avec 30 ± 7 mM. L'activité para-nitrophényl phosphatasique neutre des feuilles de *Medicago minima* pourrait être utilisée pour la détection de symptômes écotoxicologiques en milieu naturel.

Dans un précédent article, nous avons établi les principales caractéristiques cinétiques des phosphatases foliaires de la luzerne sauvage *Medicago minima* dans les conditions de pH neutre correspondant à celles du milieu cellulaire naturel, et examiné l'homogénéité de leur distribution à partir d'échantillons provenant de cinq stations écologiques différentes, sur un même biotope (1).

Bien que la spécificité des phosphatases des chloroplastes végétaux soit relativement faible (2, 3, 4), de notables différences ont été observées dans les valeurs respectives de la constante de dissociation des complexes formés par une sédoheptulose-1,7-diphosphatase avec son substrat naturel et avec le fructose-1,6-diphosphate (5).

Notre objectif étant de caractériser les propriétés générales du complexe phosphatasique foliaire en vue d'un premier criblage rapide des effets éventuels de xénobiotiques toxiques, il paraissait toutefois intéressant de caractériser le degré de spécificité apparente du complexe total vis-à-vis de divers substrats naturels. En effet, les variations de l'activité enzymatique globale seront affectées par les concentrations cellulaires en substrats en proportion de leur spécificité cinétique et l'interprétation des études toxicologiques en dépendra donc également.

Au cours de cette étude, nous avons adopté une méthode d'analyse dans laquelle les propriétés de chaque substrat naturel sont déterminées à partir de son comportement comme pseudo-inhibiteur de l'activité mesurée en continu à partir d'un substrat chromogène artificiel.

Matériel végétal et techniques. — Les échantillons foliaires proviennent de stations de *Medicago minima* récoltées en biotope naturel et les extraits enzymatiques ont été préparés comme précédemment (1).

La compétition de substrats obéit au mécanisme moléculaire suivant :

$$\begin{array}{l} E + {}_{n_0}S \overset{K_S}{\rightleftharpoons} (ES)_{n_0} \rightarrow Q \text{ mesuré} \\ + {}_{n_L}L \\ \quad \downarrow\uparrow K_L \\ (EL)_{n_L} \rightarrow P \text{ non mesuré} \end{array}$$

dans lequel E représente l'unité enzymatique fonctionnelle minimale, S le substrat chromogène artificiel, L le substrat non-chromogène naturel, n_0 et n_L leurs coefficients de Hill respectifs, K_s et K_L leurs constantes

de dissociation respectives. Q représente le para-nitrophénol et P les ions phosphates libérés par les substrats naturels.

Les vitesses maximales, les coefficients de Hill n_0 et n_R (résultant) et les constantes de dissociation apparentes ont été calculées d'après les méthodes algébriques précédemment décrites (6, 7). Les coefficients n_L ont été déterminés préalablement dans un travail séparé (8). Les constantes K_L dont la détermination fait l'objet du présent travail, sont exprimées dans les équations suivantes :

$$v_R/V_M = S^{nR}/(K_R + S^{nR}) \qquad [1]$$

dans laquelle v_R et K_R représentent respectivement la vitesse initiale et la constante apparente. Cette constante est elle-même fonction des concentrations en substrats naturels (L) et de leurs constantes respectives K_L selon la variation :

$$K_R = K_s(1 + [(L^{nL}/K_L]) \qquad [2]$$

d'où la relation finale donnant K_L :

$$K_L = L^{nL}/[(K_R/K_s) - 1] \qquad [3]$$

Il est important de souligner qu'en raison du rôle joué par le produit de la réaction (l'action rétro-inhibitrice du phosphate a été vérifiée au cours de cette étude), il n'était pas possible d'appliquer la méthode utilisant une seule courbe cinétique pour la détermination des K_L (9).

Les probabilités associées aux comparaisons de moyennes ont été calculées à partir de l'équation de distribution du « t » de Student, au moyen d'une calculatrice TI-74.

Résultats. — Les figures 1, 2, 3 présentent respectivement les courbes de saturation obtenues en présence de β-glycéro-phosphate, de glucose-1 et 6 phosphate, de fructose-6-phosphate et de fructose-1-6-diphosphate. Les courbes obtenues en présence de la même concentration du radical organique libre ont été également établies et introduites sur les figures à titre de comparaison.

Le Tableau I présente les valeurs des paramètres résultants mesurés en présence de 40 mM de chacun des substrats naturels phosphorylés, ainsi que celles obtenues pour chacun des témoins correspondants. Les vitesses maximales ne sont pas significativement altérées, à l'exception d'une légère diminution ($f_i' = 1{,}12$) observée dans le cas du fructose-1-6-diphosphate. En revanche, les constantes résultantes sont significativement augmentées dans tous les cas. Les coefficients de Hill résultants (n_R en présence de L et n_0 pour $L = 0$, c'est-à-dire pour le pNPP pur) sont tous inférieurs à 1 et peu modifiés par la présence des substrats compétiteurs. Ils restent du même ordre de grandeur quoique légèrement augmentés, par rapport aux valeurs initiales.

Les facteurs d'inhibitions K_R/K_s, les valeurs correspondantes

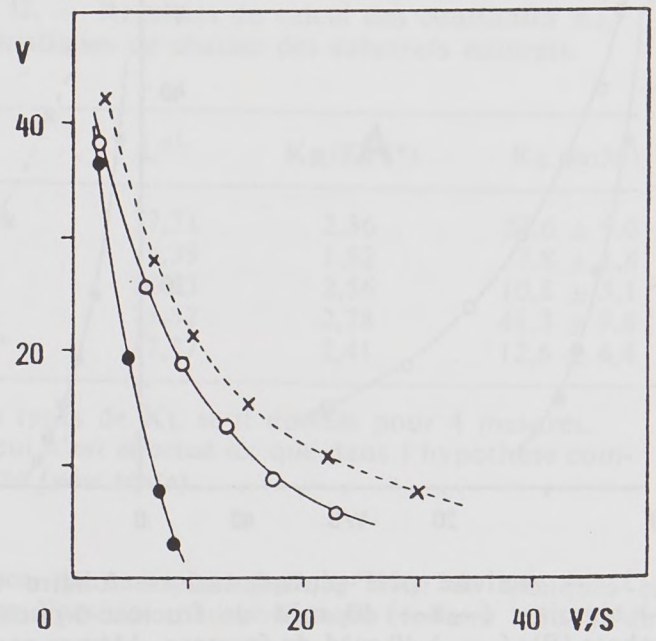


FIG. 1.— Activité pNP-phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima:* (—o—) témoins ; (—●—) 40 mM de glycérol-2-phosphate; (···×···) 40 mM de glycérol. Représentations de Augustinsson-Woolf: v = vitesses initiales ($\mu M.mn^{-1}.mg^{-1}$) et S = concentrations en pNPP (mM).

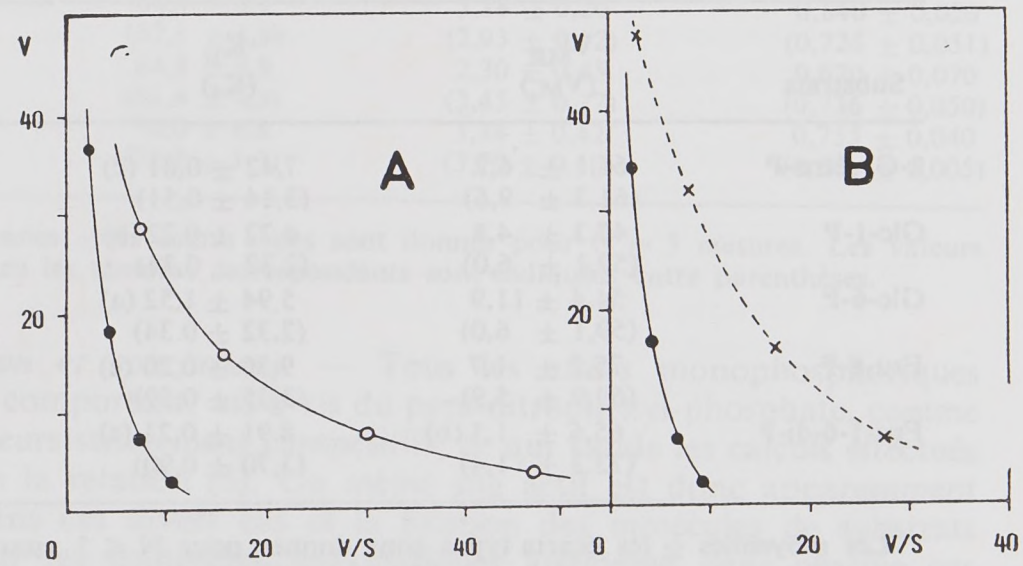


FIG. 2. — Activité pNP-phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima:* (—o—) témoins; (—●—) 40 mM de glucose-1-phosphate (A) ou de glucose-6-phosphate (B); (···×···) 40 mM de glucose. Mêmes coordonnées que sur la Figure 1.

de L^{nL} et les résultats du calcul des constantes K_L sont indiqués dans le Tableau II. Le fructose-6-phosphate se distingue par une valeur significativement plus élevée ($P < 0,05$) que celle des autres hexoses-phosphates, qui se situent toutes autour d'une valeur moyenne de 10,4 $\pm$ 2,4 mM. Le glycérol-2-phosphate se situe à un niveau intermédiaire entre ces deux extrêmes. Bien que le facteur de spécificité apparaisse

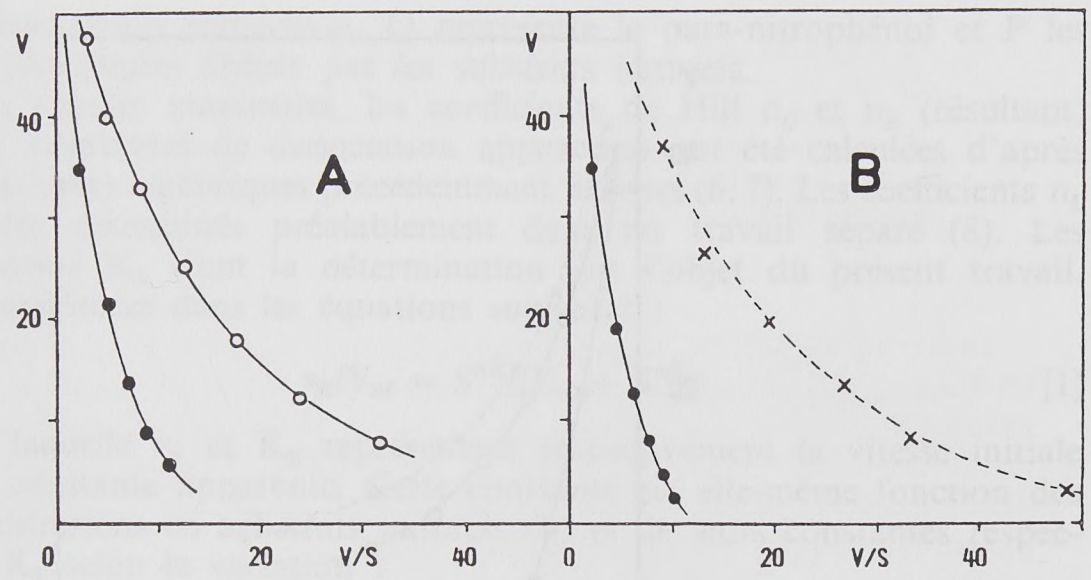


FIG. 3. — Activité pNP-phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima:* (—○—) témoins; (—●—) 40 mM de fructose-6-phosphate (A) ou de fructose-1-6-diphosphate (B); (···×···) 40 mM de fructose. Mêmes coordonnées que sur la Figure 1.

TABLEAU I. — Paramètres cinétiques mesurés en présence de divers substrats (40 mM).

Substrats	V_{MR} (V_{M_0})	K_R (K_S)	n_R (n_0)
β-Glycéro-P	64,1 ± 6,2	7,42 ± 0,81 (c)	0,854 ± 0,023
	(61,3 ± 9,6)	(3,14 ± 0,51)	(0,717 ± 0,041)
Glc-1-P	47,3 ± 4,8	4,22 ± 0,22 (b)	0,873 ± 0,087
	(59,1 ± 6,0)	(2,32 ± 0,34)	(0,763 ± 0,067)
Glc-6-P	54,4 ± 11,9	5,94 ± 1,52 (a)	0,850 ± 0,061
	(59,1 ± 6,0)	(2,32 ± 0,34)	(0,763 ± 0,067)
Fru-6-P	75,2 ± 1,7	9,30 ± 0,20 (c)	0,784 ± 0,010
	(69,9 ± 5,9)	(3,35 ± 0,59)	(0,691 ± 0,035)
Fru-1-6-di-P	65,6 ± 1,1 (b)	8,91 ± 0,21 (c)	0,816 ± 0,003
	(73,3 ± 1,4)	(3,70 ± 0,90)	(0,671 ± 0,005)

Les moyennes ± les écarts types sont donnés pour $N \leqslant 3$ mesures. Les valeurs obtenues pour les témoins correspondants sont indiquées entre parenthèses. Glc = glucose; Fru = fructose. Les coefficients n_0 correspondent au pNPP pur ($L = 0$).

Différences significatives : (a) $P < 0,05$; (b) $P < 0,01$; (c) $P < 0,001$.

comme modéré, il semblait utile d'examiner l'influence éventuelle du radical organique libre. Le tableau III présente les valeurs des paramètres V_{MR} et K_R mesurées en présence des radicaux non phosphorylés introduits dans le milieu réactionnel à la même concentration que les esters phosphoriques, soit 40 mM. Aucune influence significative n'est observée vis-à-vis de ces paramètres.

TABLEAU II. — Résultats du calcul des constantes K_L caractéristiques de chacun des substrats naturels.

Substrats	L^{nL}	K_R/K_S (*)	K_L (mM)
Glycérol-2-P	37,71	2,36	27,6 ± 9,0
Glc-1-P	6,39	1,82	7,8 ± 1,8
Glc-6-P	16,93	2,56	10,8 ± 5,1
Fru-6-P	73,52	2,78	41,3 ± 9,8
Fru-1-6-di-P	17,77	2,41	12,6 ± 4,4

Les écarts types de K_L sont donnés pour 4 mesures.
(*) Le calcul n'est effectué ici que dans l'hypothèse compétitive stricte (voir texte).

TABLEAU III. — Influence du radical organique libre de quelques esters phosphorylés (40 mM) sur l'activité phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima*.

Radicaux	V_{MR} (V_{M_0})	K_R (K_S)	n_R (n_0)
Glycérol	64,7 ± 3,1	3,18 ± 0,20	0,640 ± 0,020
	(57,1 ± 3,9)	(2,93 ± 0,12)	(0,726 ± 0,051)
Glucose	64,8 ± 8,9	2,30 ± 0,45	0,670 ± 0,070
	(61,4 ± 4,9)	(2,45 ± 0,27)	(0,736 ± 0,050)
Fructose	70,0 ± 6,8	3,34 ± 0,42	0,755 ± 0,040
	(73,2 ± 1,3)	(3,70 ± 0,10)	(0,671 ± 0,005)

Les moyennes ± les écarts types sont donnés pour N = 3 mesures. Les valeurs mesurées chez les témoins correspondants sont indiquées entre parenthèses.

Discussion et conclusions. — Tous les esters monophosphoriques étudiés se comportent, vis-à-vis du para-nitrophényl-phosphate, comme des inhibiteurs strictement compétitifs, ce qui valide les calculs effectués à partir de la relation (3). Un même site actif est donc apparemment sollicité dans ces divers cas et la fixation des molécules de substrats naturels sur les complexes enzymatiques augmente dans chaque cas le coefficient de Hill apparent du pNPP. Par contre, le fructose-1-6-diphosphate présente un comportement apparent d'inhibiteur mixte. Le rapport V_M/K est de 7,36, contre 19,8 chez les témoins. Ceci correspondrait à un facteur d'inhibition compétitive réel $f_i' = 2,69$ ce qui correspond à une valeur de K_L légèrement inférieure à la précédente estimation (Tableau II) soit : $K_L = 10,5$ mM. La constante K_L' correspondrait théoriquement à la fixation du pseudo-inhibiteur sur le complexe entre l'enzyme et le substrat artificiel : sa valeur serait, dans ce

cas, très élevée : K'_L = 150,8 mM. Ceci montre que, même dans le cas du fructose-1-6-diphosphate, le mécanisme s'écarte peu du type compétitif. Il est d'ailleurs permis de s'interroger sur la possibilité d'un autre mode d'action possible de ce substrat dont on connaît le rôle inhibiteur lorsqu'il est présent en excès dans le milieu réactionnel, vis-à-vis de la fructose-1-6 diphosphatase du cortex rénal, par exemple (10). Il est intéressant de noter que le glucose-1-phosphate, qui contient, comme le fructose 1-6 diphosphate, une liaison ester phosphorique en position 1, c'est-à-dire près de l'atome d'oxygène du cycle, provoque également un abaissement de la valeur de la vitesse maximale (f'_i = 1,25). Cependant, celui-ci n'est pas significatif du fait de l'importance des écarts types. Ceci correspondrait à une valeur de K'_L = 25,6 mM, et ramènerait la valeur de K_L à 5,01 mM. Ce calcul montre que la spécificité apparente pourrait être, en définitive, légèrement plus marquée que ne le laissaient prévoir les calculs initiaux. Dans le cas d'une fraction enzymatique purifiée à partir des chloroplastes d'épinard, le fructose-1-6-diphosphate se distingue des autres substrats par une valeur considérablement plus faible de la constante K_m qui se situe à l'échelle micromolaire (5). Dans les extraits de feuilles de *Medicago minima* à pH neutre, la plus forte affinité est observée pour le glucose-1-phosphate et la plus faible pour le fructose-6-phosphate.

Les valeurs observées pour les constantes de dissociation apparentes K_L sont relativement fortes par comparaison avec celles mesurées pour le substrat artificiel soit 2,97 $\pm$ 0,62 mM : ce dernier présente généralement une forte affinité pour de nombreuses formes moléculaires de phosphatases (2, 11), tandis que les substrats naturels ont une meilleure affinité pour une forme particulière de l'enzyme; ainsi, le glycérol-3-phosphate présente une constante d'affinité de 2 mM vis-à-vis de la glycérol-3-phosphate phospho-hydrolase de l'épinard (2).

Les mesures effectuées à l'aide du para-nitrophényl-phosphate dans l'extrait enzymatique brut paraissent donc assez représentatives des valeurs caractéristiques de l'affinité des substrats naturels pour les formes enzymatiques qui leur sont les plus spécifiques (11).

Au contraire, l'affinité apparente calculée pour les substrats naturels reflète la résultante d'une série d'interactions avec diverses formes moléculaires enzymatiques dont un nombre limité seulement forment un complexe du substrat dont la constante d'association est élevée. Les mesures effectuées ici tendraient, enfin, à suggérer que la position du radical phosphate sur le carbone 1 d'un hexose est moins favorable que la position sur le carbone 6.

L'étude de l'activité phosphatasique foliaire neutre de *Medicago minima* au moyen du para-nitrophényl-phosphate devrait pouvoir servir de crible pour la détection d'anomalies écotoxicologiques. Ce travail devrait se poursuivre par la séparation du spectre des formes moléculaires en présence et l'étude des propriétés spécifiques de chacune

d'entre elles, de manière à affiner la valeur sémiologique des résultats en cas de réponse toxicologique positive (*).

1. Morgan M. R. J. & Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1989, *183*, 208-215.
2. Mulligan R. M. & Tolbert N. E., *Plant Physiol.*, 1980, *66*, 1169-1173.
3. Gontero B., Meunier J. C. & Ricard J., *Plant. Sci. Letters*, 1984, *36*, 137-142,
4. Cadet F. & Meunier J. C., *Biochem. J.*, 1988, *253*, 249-254.
5. Gontero B., Meunier J. C. & Buc J., *Adv. Photosynth. Res.*, Proc. 6th. Int. Congr. 1983, *3*, 505-508.
6. Bounias M., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1979, *63B*, 407-417.
7. Bounias M., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1989, *3*, 1-9.
8. Morgan M. R. J. & Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1989, *183*, 314-320.
9. Hwang S. Y., Brown K. S. & Gilvarg C., *Anal. Biochem.*, 1988, *170*, 161-167.
10. Vargas A. M., Communication personnelle, 1989.
11. Barman T. E., Enzyme Handbook, 1969, vol. II, Springer-Verlag, 530-539.

(*) Le Dr Morgan exprime ses remerciements à B. D. H., I. C. I., I. N. R. A., Rhône-Poulenc, la Royal Society et Sigma Chimie pour leur soutien financier. Les auteurs remercient Mme Daurade pour sa participation à la préparation des expérimentations et Mme Bareste pour la préparation matérielle du texte.

IV-2- Etude du rôle des tréhalases cérébrales d'insectes-

Collaboration avec l'Université de Bordeaux
Laboratoire de Physiologie Animale (Prof. Girardie) :
Métabolisme (Prof. J. Dutrieu)

Dr. R. Moreau , Dr. L. Gourdoux

La mise en évidence antérieure d'une interaction moléculaire directe de la tréhalase avec un peptide insulino semblable, a révélé l'intervention possible de cette enzyme dans le contrôle de la diapause-

L'analyse de cette interaction moléculaire se poursuit-

Le rôle physiologique des Tréhalases cérébrales a fait l'objet de deux publications et de la soutenance d'une thèse de Doctorat nouveau régime-

C. R. Acad. Sci. Paris, t. 309, Série III, p. 121-126, 1989

Physiologie animale/*Animal Physiology*

L'activité tréhalasique cérébrale et ses variations au cours du développement direct et de la diapause chez *Pieris brassicae* L. (Insecte : Lépidoptères)

Jacques Puiroux, Robert Moreau, Lucienne Gourdoux, Michel Bounias et Janine Dutrieu

Résumé — L'activité tréhalasique cérébrale des piérides a été déterminée aux différents stades de la fin du développement direct et comparée à celle des piérides à développement diapausant. L'activité enzymatique cérébrale est maximale pendant la phase d'alimentation obligatoire en début du dernier stade larvaire et chez la jeune imago. Par contre, celle-ci est faible au cours de la vie nymphale dans le cas du développement direct et elle s'effondre pendant la diapause nymphale. La rupture de la diapause s'annonce par une reprise graduelle et continue de l'activité tréhalasique cérébrale. Un séjour prolongé (2 mois) en conditions hivernales semble obligatoire pour obtenir ce résultat. Cette reprise d'activité enzymatique cérébrale pourrait constituer l'un des indicateurs les plus précoces de la rupture de la diapause. Aucune différence significative n'a été observée dans l'activité enzymatique cérébrale des imagos à développement direct ou issues d'une diapause nymphale.

Brain trehalase activity and its variations during direct and diapausing development in *Pieris brassicae* L. (Insecta: Lepidoptera)

Abstract — *Toward the end of the development of* Pieris brassicae, *brain trehalase activity was studied and compared between direct and diapausing developments. Specific activity of brain trehalase was observed to be maximal during the obligatory feeding phase at the beginning of the last larval instar in non-diapausing and diapausing insects. On the contrary, brain trehalase activity decreased during pupal life and became very weak during pupal diapause. The action of cold during a long wintering period (2 months) induced a breaking-down of diapause and as a result, brain trehalase activity increased progressively. This observation could be used as a precocious index to forecast imminent adult emergence in wild population of destructive insects. Brain trehalase activity of imaginal insects resulting from diapausing development pupæ was similar to that of adults coming from direct development.*

Abridged English Version — In most insect species, hemolymph trehalose is the major substrate for energy metabolism [3]. Trehalase (α-α′ glucosidase-1-glucohydrolase; EC.3.2.1.28.) is the specific enzyme responsible for trehalose catabolism and it is localized in several tissues of the insect body ([10], [11]). Brain trehalase mediates the glucose supply to the nervous system. The aim of the present report was to measure the variations of brain trehalase specific activity during the development cycle and during diapausing status, when the insects are submitted to wintering conditions (4°C) or maintained in estival conditions (22°C).

Non diapausing pupæ were obtained after rearing larvæ under a long photoperiod: 16 hrs. light and 8 hrs. dark (16 L/8 D). On contrary, diapausing pupæ needed a short photoperiod (8 L/16 D). They were devided in two batches; the first batch consisted in diapausing pupæ stored at 4°C and under a short photoperiod (wintering conditions); in the second batch, diapausing animals were placed at 22°C and under a long photoperiod (estival conditions). Brain tissue extractions were carried out using a microscope. Tissue samples were washed in saline, rinced and frozen in liquid nitrogen. All sample assays were composed of 50 pooled brains. Brain trehalase specific activities were measured as described in [14] and [15].

Note présentée par Jean Roche.

0249-6313/89/03090121 $ 2.00 © Académie des Sciences

In non diapausing larvæ (Table I), we observed a relatively high brain trehalase activity during the active feeding phase. Then, before pupation, the brain trehalase activity decreased significantly. During the diapausing larval instars, in contrast with non diapausing larvæ, brain trehalase maintained a high specific activity until the end of the larval life.

At the beginning of direct development pupal life (Table II), brain trehalase activity was half of the maximum value obtained in larvæ. From this stage, the level of activity increased again towards imago emergence. Pupal diapause induced a large and long lasting decrease of brain trehalase activity. When diapausing pupæ were placed in wintering conditions (4°C) for a long time (2 months), we were able to observe a gradual recovery of activity in brain trehalase. The diapausing pupæ, maintained in estival conditions (22°C), exhibited a lower value of trehalase activity up to their death. Following the cold period, if the diapausing insects return to estival conditions (22°C), 70% of the insects were able to give rise to adults after a 2 week delay. In the young imago, in which the cerebral mass increases 30 times compared to the larval stage, brain trehalase activity exhibited high values. Brain trehalase activity of imaginal insects resulting from diapausing development pupæ was similar to that of adults following direct development.

In contrast to mammals, brain tissues in insects are richer in carbohydrate content and glycogen can be found in their central nervous system, particularly in glial cells [1]. Brain energy is steadily provided by hemolymph sugar and lipid sources, in which trehalose constitues the major component. Brain glycogen stores can be reconstituted from hemolymph trehalose via brain trehalase activity. Thus the level of the specific activity of brain trehalase can be regarded as a general index of metabolic activity and the energetic demand of insect neural tissues during the different development phases. Thus, during the active feeding period, in non diapausing as well as in diapausing insects, brain trehalase activity exhibited high values. During the pupal stage, motor activity is much reduced and energetic needs are less great. Brain trehalase activity decreases significantly in the two pupal types, but more so in diapausing pupæ and also for a longer time. The action of cold, during a long wintering period, induced diapause breakdown, and as a result, brain trehalase activity increased progressively. This observation may have significance ecological importance since it could be used as a precocious index to forecast imminent adult emergence in wild populations of destructive lepidopteran insects.

INTRODUCTION. — Chez les insectes, le métabolisme cérébral et l'activité des enzymes qui s'y rattachent sont assez mal connus. La principale raison de cet état de chose semble liée au fait qu'il est difficile de se procurer des quantités importantes de tissu nerveux, compte tenu de la petite taille de ces animaux. A notre connaissance il existe peu de travaux sur ce sujet et ils ne concernent que les insectes d'une taille relativement importante [1]. Comme chez les vertébrés, il semble que la source énergétique de choix du tissu nerveux des insectes soit le glucose; cependant, ce glucide n'est présent qu'en très faible concentration dans l'hémolymphe ([2], [3]). Ainsi pour beaucoup de tissus chez l'insecte, la source glucidique principalement et directement disponible se trouve localisée dans l'hémolymphe. Elle est représentée par le tréhalose (α-α′ diglucoside non réducteur). Ce glucide libère du glucose sous l'action de glucohydrolases présentes dans l'hémolymphe ou au sein des tissus : il s'agit des tréhalases, enzymes de la catégorie des α-glucosidases (EC-3-2-1-20) dont les formes peuvent être variées ([4], [5], [6]). Si, dans la littérature scientifique les tréhalases de l'hémolymphe ([7], [8], [9]), de l'appareil génital ([10], [11])

43

TABLEAU I

Activités tréhalasiques cérébrales des larves V de piéride. Résultats exprimés en nanomoles de glucose par heure par milligramme de protéines. Moyenne de 5 à 7 échantillons ± S.E.M.

Brain trehalase activities in Vth instar larvæ of Pieris brassicae. *Results are expressed in nanomol glucose per hour per milligramme of protein. Means ± S.E.M. are given for 5 to 7 independent determinations.*

Jours	Développement continu	Développement diapausant	Comparaisons (p) continu/ diapause
1.	8 459 ± 539	6 823 ± 131	0,000 14
2.	9 541 ± 888	7 463 ± 474 (*a*)	0,004
3.	9 591 ± 279 (*b*)	8 460 ± 259 (*c*)	0,000 4
4.	7 187 ± 93 (*c*)	7 821 ± 165 (*a*)	0,000 13
5.	6 571 ± 284 (*c*)	7 260 ± 215 (*b*)	0,007
6.		8 254 ± 288	

Différences significatives par rapport au 1er jour pour chaque série : (*a*) $p \leqq 0{,}03$, (*b*) $p \leqq 0{,}01$, (*c*) $p \leqq 0{,}001$.

du tissu intestinal [12] du corps adipeux [14] ont souvent été étudiées, en revanche, celles du tissu cérébral n'ont pas fait l'objet d'études approfondies [1]. Or, le cerveau des insectes, outre son importance dans la vie de relation, représente aussi le principal centre neuroendocrinien. Ses rôles sont essentiels sur le déterminisme des phases du développement, de la croissance et de la reproduction. L'objet de ce bref mémoire est l'étude de l'activité tréhalasique cérébrale au cours du développement direct et pendant la diapause nymphale facultative, en relation avec des conditions climatiques de type estival ou hivernal.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les larves de *Pieris brassicae* à développement direct (sans diapause) sont élevées sur feuilles de chou à la température de 22-24°C avec une photopériode longue de 16 h et une scotopériode de 8 h et 70 % d'humidité de référence. Dans ces conditions, la durée du premier stade larvaire est de 5 jours environ. La vie de la nymphe (ou chrysalide) dure 10 à 12 jours; la vie adulte 8 jours.

Les larves de *Pieris brassicae* à développement diapausant sont nourries de la même façon que ci-dessus, mais subissent une température d'élevage de 16-18°C avec une photopériode de 8 h et une scotopériode de 16 h avec 70 % d'humidité de référence. Dans ce cas, la durée du dernier stade larvaire est d'environ 6 jours. La diapause nymphale peut se prolonger plusieurs mois. La rupture de l'état diapausant peut être obtenue après un séjour minimal de 60 à 80 jours à +4°C. Le retour des nymphes diapausantes (ayant subi l'action prolongée du froid) à des conditions estivales de température (22-24°C) et de lumière (16 L-8 D), permet l'émergence d'une partie des imagos (70 %) sous un délai de 12 à 15 jours après la sortie du froid. Au contraire, si l'on maintient les chrysalides diapausantes dans des conditions climatiques estivales dès la nymphose, aucune émergence ne peut être observée plusieurs mois après l'entrée en diapause.

Les cerveaux de larves, de nymphes ou d'adultes, sont prélevés chirurgicalement, lavés dans du liquide physiologique d'Ephrussi puis immédiatement congelés dans l'azote liquide. Chaque lot comporte 50 cerveaux. Il est ensuite placé dans 500 µl de tampon de Britton et Robinson à pH 6,3 broyé aux ultra-sons pendant 1 mn, puis ultracentrifugé à 12 000 g pendant 30 mn à +4°C. Le surnageant contient la tréhalase cérébrale. L'activité spécifique de l'enzyme a été déterminée au moyen de la quantité de glucose libéré par hydrolyse du tréhalose (28 mM), dans les conditions optimales de pH et de température

TABLEAU II

Activités tréhalasiques cérébrales des nymphes de piérides. Résultats exprimés en nanomoles de glucose par heure par milligramme de protéines. Moyennes de 5 à 7 échantillons ± S.E.M.

Brain trehalase activities of Pieris brassicae *pupae. Results are expressed in nanomol glucose per hour per milligramme protein. Means ± S.E.M. are given for 5 to 7 independent determinations.*

Jours	Développement continu	Développement diapausant 16-18°C		Comparaisons (*p*) continu/diapause
1.	4944 ± 161	6434 ± 264		6,00 E-06
3.	4742 ± 238	3411 ± 115 (*b*)		4,00 E-06
5.	4886 ± 58	3413 ± 58 (*b*)		1,00 E-07
7.	4943 ± 201	2393 ± 140 (*b*)		3,40 E-02
9.	5062 ± 185	2164 ± 47 (*b*)		1,00 E-07
11.	6496 ± 289 (*a*)	2317 ± 68 (*b*)		1,00 E-07
		16-18°C	4°C	16-18°C/4°C
30.		2891 ± 42 (*b*)		
45.		3357 ± 107 (*b*)	4148 ± 104	4,00 E-06
60.		2563 ± 87 (*b*)	4448 ± 125	1,00 E-07
Imago.	7744 ± 178 (*b*)			

Différences significatives par rapport au 1er jour pour chaque série : (*a*) $p \leqq 10^{-5}$, (*b*) $p \leqq 10^{-6}$.

de l'enzyme préalablement estimées à pH 6,3 et 40°C. Le temps d'incubation nécessaire est de 120 mn. La mesure du glucose libéré a été effectuée grâce à un auto-analyseur « Technicon ». Cet appareil utilise la détection spectro-photométrique à 420 nm, de la réduction du ferricyanure de potassium.

La quantité totale des protéines présentes dans les extraits a été mesurée d'après la méthode de Bradford [15] au moyen de la préparation commercialisée par « Bio-Rad Laboratories, West Germany » (réf. n° 500.006). Les solutions étalons ont été réalisées à partir de globulines plasmatiques bovines. Les valeurs moyennes obtenues ont été de 0,4 µg/ml d'extraits pour les larves, de 3 µg/ml d'extrait pour les nymphes et de 8,5 µg/ml pour les imagos.

Les moyennes et les variances ont été calculées à partir de 5 à 7 échantillons différents ayant permis chacun 4 à 6 mesures répétées; les probabilités de signification (*p*) associées aux comparaisons de moyennes ont été déduites de la distribution du « *t* » de Student.

RÉSULTATS. — Le tableau I explicite les variations de l'activité tréhalasique cérébrale au cours du 5e et dernier stade larvaire de *Pieris brassicae*. Chez les larves non diapausantes, cette activité, très élevée dès le début du stade, augmente graduellement au cours de la phase d'alimentation obligatoire jusqu'au 3e jour de la vie larvaire. Cette phase étant achevée, l'activité tréhalasique cérébrale diminue considérablement juste avant l'entrée en nymphose (−31 %). Chez les larves diapausantes, on constate au début, les mêmes variations que dans le cas du développement direct, malgré une activité tréhalasique cérébrale généralement plus faible. Au contraire, en fin de vie larvaire l'activité tréhalasique cérébrale des prénymphes à développement diapausant ne cesse d'augmenter.

Le tableau II présente les variations de l'activité tréhalasique cérébrale au cours de la vie nymphale et imaginale de *Pieris brassicae*. Dans le cas des nymphes à développement continu, l'activité de l'enzyme atteint un minimum 3 jours après la nymphose. On observe ensuite une augmentation graduelle de l'activité tréhalasique cérébrale jusqu'à l'émergence

de l'adulte. Dans le cas de la diapause nymphale, il se produit une diminution brutale et très caractéristique de l'activité tréhalasique cérébrale.

Au contraire, lorsque les chrysalides diapausantes sont placées en conditions hivernales (+4°C) pendant au moins 2 mois, il est possible d'observer une remontée très graduelle de l'activité tréhalasique, et celle-ci continue d'augmenter lorsque l'on replace les chrysalides diapausantes en conditions estivales. Ainsi, 70 % des insectes présentent une rupture de la diapause et ils sont capables d'émerger correctement après un délai de 12 à 15 jours qui suit le retour en ambiance estivale. La jeune imago dont la masse cérébrale est devenue 30 fois supérieure à celle observée en dernier stade larvaire, montre une activité tréhalasique cérébrale très élevée. Cette dernière valeur atteint un niveau comparable dans le cas où l'imago provient d'un développement direct ou diapausant.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — Contrairement à ce que l'on observe chez les mammifères, les tissus nerveux des insectes sont plus riches en glucides de réserve, et le glycogène peut être trouvé en assez grande abondance dans le système nerveux central et particulièrement dans les cellules gliales [1]. L'énergie indispensable au fonctionnement du cerveau des insectes est puisée essentiellement au niveau des glucides, parmi lesquels le tréhalose constitue la fraction principale. Le glycogène cérébral peut être reconstitué à partir du tréhalose de l'hémolymphe, grâce à l'activité de la tréhalase du tissu nerveux. Ainsi, le niveau d'activité de cette enzyme, peut être considéré comme l'un des index de l'activité métabolique et du besoin énergétique des tissus nerveux de l'insecte, pendant les différentes phases du développement. Au cours des phases nutritionnelles actives chez les piérides à développement direct, comme chez celles à développement diapausant, on observe une activité tréhalasique cérébrale très élevée. Pendant la diapause nymphale, les activités motrices et relationnelles sont considérablement réduites, corrélativement les besoins énergétiques sont au plus bas. L'activité tréhalasique effectivement suit le même mouvement, en décroissant d'une manière significative au cours de la vie nymphale. Cet état de chose s'établit pour longtemps dans le cas de diapausants. L'action d'une longue période de froid (2 mois) à ce stade, finit par induire la levée de la diapause et en conséquence, on peut observer une reprise de l'activité tréhalasique cérébrale. Dans des travaux antérieurs ([16], [17], [18]), nous avions démontré qu'un taux élevé en tréhalose chez la piéride pendant la vie nymphale, signait, au même titre qu'un taux élevé en glycérol dans d'autres espèces [19], l'existence d'un état de diapause au plan métabolique. La diminution rapide du taux sanguin de tréhalose est un événement qui autorise une estimation précoce et rationnelle de la levée de la diapause et par conséquent, permet une prévision assez correcte de l'émergence des adultes. Cela peut être précieux pour les services de la protection des végétaux, chargés de diffuser les bulletins d'informations concernant les vagues d'apparition des insectes ravageurs. Le présent travail, selon nous, permet d'améliorer encore la précocité de ces prévisions, car la reprise de l'activité tréhalasique cérébrale que nous avons constatée, précède de plusieurs jours la chute des taux sanguins hémolymphatiques du tréhalose, annonciatrice de la levée de la diapause.

M. R. Lafont a aimablement fourni aux auteurs les souches de piérides de leurs élevages.

Note remise le 20 mars 1989, acceptée après révision le 26 mai 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] R. H. C. STRANG, in *Energy metabolism in insects*, Downer, Plenum Press, New York, 1981, p. 169-206.
[2] M. BOUNIAS, *Analusis*, 4, 1976, p. 87-93.
[3] J. E. STEELE in *Energy metabolism in insects*, Downer, Plenum Press, New York, 1981, p. 101-133.

[4] M. Bounias, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 285, série D, 1977, p. 1263-1266.
[5] M. Bounias et M. R. J. Morgan, *Internat. J. Biochem.*, 6, 1984, p. 939-941.
[6] M. Bounias, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 297, série III, 1983, p. 583-588.
[7] G. R. Wyatt, *Advances in Insect Physiol.*, 4, Acad. Press, London, 1967, p. 287-360.
[8] J. Dutrieu et L. Gourdoux, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 265, série D, 1967, p. 1067-1070.
[9] A. P. Jahagirdar, R. G. H. Downer et T. Viswanatha, *Biochem. Biophys.*, 801, 1984, p. 177-183.
[10] O. Yamashita, K. Hasegawa et M. Seki, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18, 1972, p. 515.
[11] O. Yamashita et K. Hasegawa, *J. Insect Physiol.*, 22, 1976, p. 409-414.
[12] T. Yaginuma et G. H. Happ, *J. Comp. Physiol.*, B, 157, 1988, p. 765-770.
[13] M. Sumida et O. Yamashita, *Insect Biochem.*, 13, 1983, p. 257-265.
[14] A. Bahjou, R. Moreau, M. Bounias, L. Gourdoux et J. Dutrieu, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 303, série III, 1986, p. 655-660.
[15] M. M. Bradford, *Analytic Biochem*, 72, 1976, p. 248-254.
[16] R. Moreau, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 268, série D, 1969, p. 1441-1444.
[17] R. Moreau, *Thèse Doct. es Sc.*, C.N.R.S., A.O. 8458.
[18] R. Moreau, L. Gourdoux, A. Bahjou et L. Lavenseau, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 300, série III, 1985, p. 157-160.
[19] E. Asahina et K. Tanno, *Nature*, London, 204, 1964, p. 1222.

Laboratoire de Physiologie, Métabolisme, U.R.A. C.N.R.S. n° 1138,
Université de Bordeaux-I, 33405 *Talence Cedex*
et *Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A.-Avignon*, 84140 *Montfavet.*

47

Comp. Biochem. Physiol. Vol. 94B, No. 1, pp. 53–57, 1989
Printed in Great Britain

0305-0491/89 $3.00 + 0.00
© 1989 Pergamon Press plc

RELATIONSHIP BETWEEN BRAIN TREHALASE ACTIVITY AND TREHALOSEMIA DURING DIRECT AND DIAPAUSING DEVELOPMENT IN *PIERIS BRASSICAE*

JACQUES PUIROUX,* ROBERT MOREAU,* LUCIENNE GOURDOUX* and MICHEL BOUNIAS†

*UA CNRS 1138, Laboratoire de Physiologie Animale "Métabolisme", Université de Bordeaux I, avenue des Facultés 33405 Talence Cedex, France (Tel: 16 56 80 6800); and †Laboratoire de Biochimie INRA-AVIGNON, 84140 Montfavet, France

(*Received* 10 *January* 1989)

Abstract—1. Brain trehalase specific activity and trehalosemia were measured during the end of the developmental life cycle in non-diapausing and diapausing insects.

2. During non-diapausing development, trehalosemia reached maximum values at the beginning of pupal life. Then a constant decrease was observed up to the end of adult life.

3. The specific activity of brain trehalase was maximum when the insects were in active feeding periods, minimum activity appearing during moulting phases.

4. During diapausing development, trehalosemia was very high at the beginning of pupal life, particularly when insects were exposed to wintering conditions.

5. When diapause was broken, trehalosemia fell, announcing adult emergence.

6. Brain trehalase activity showed the same qualitative variations as in non-diapausing larvae, but with rather lower values.

7. During pupal life, brain trehalase activity decreased markedly during the long period necessary to obtain diapause breakdown.

8. Wintering conditions allow a progressive increase of brain trehalase activity, which preceded the fall of trehalosemia.

INTRODUCTION

The metabolism of the insect nervous system is not at present very well understood. One of the most obvious reasons is the difficulty of obtaining sufficient tissue, especially in small insects. To our knowledge, there is only one recent review on this subject, and that concerned only large insects such as the locust and cockroach.

In most insect species, hemolymph trehalose is the major substrate for brain energy metabolism. It also plays an important metabolic role for many biochemical syntheses during the insect developmental life cycle (Chippendale, 1978; Bounias and Morgan, 1981; Steele, 1981). The specific enzyme responsible for trehalose catabolism is trehalose (α-α′ glucosidase-1-glucohydrolase; EC 3.2.1.28). This enzyme exists in different isoenzyme forms (Bounias, 1983), located in several tissues of the insect body (Zebe and McShan, 1959; Saito, 1960; Gilby *et al.*, 1967; Yamashita *et al.*, 1972; Yamashita and Hasegawa, 1976; Jahagirdar *et al.*, 1987). In each tissue, trehalose metabolism might be specifically controlled by one characteristic group of trehalase isoenzymes (Wyatt, 1967; Friedman, 1978).

Mechanisms regulating trehalase activity are not well understood. Trehalases are inducible by their substrate (Bounias and Morgan, 1981) and retroinhibited by glucose, the reaction product (Bounias, 1977). Elsewhere Lenartowicz and Niemierko (1968) and Rosinski *et al.* (1979) have shown that starvation causes a decrease in intestinal trehalase activity. Moreover, hormones may be involved in the regulation of trehalase activity; in *Bombyx mori* (Shimada and Yamashita, 1979) the control of ovary trehalase activity is assumed to be mediated by the diapause hormone. In the cockroach, Jahagirdar *et al.* (1984) gave evidence that octopamine can induce an indirect increase in blood and muscular trehalase activity. Recently Bahjou *et al.* (1986) demonstrated that fat body trehalase activity is directly stimulated by an intestinal insulin-like hormone in *Tenebrio molitor*.

The aim of the present study was to measure brain trehalase specific activity variations and their relation to trehalosemia in *Pieris brassicae* during the direct development cycle, and during the diapausing status, when the insects are subjected to wintering conditions.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Direct development insects. Pieris brassicae larvae were fed on cabbage leaves at long photoperiods (16 L–8 D) at a temperature of 23°C and 70% reference humidity. Under these conditions, the whole five larval instars last about 20 days; pupal stage 11 days; and imaginal life 5–6 days.

Diapausing development insects. Pieris brassicae larvae received the same food and were also kept at 70% reference humidity but differed in having a shorter photoperiod (8 L–16 D) and a lower temperature (17°C). Under these conditions, larval instars last about 30 days and diapausing pupal life several months. At the 14th day of diapausing pupal life, the insects were separated into two batches.

The first batch was placed under wintering conditions for several months (short photoperiod 8 L–16 D at 4–5°C). After that, insects were replaced in estival conditions (long

photoperiod 16 L–8 D at 23°C) to obtain emergence which was achieved by about 72% of animals after a period lasting about two weeks.

The second batch was maintained under estival conditions (16 L–8 D at 23°C) for up to 200 days; during which time, the pupal diapause was not broken, and the insects died progressively.

Methods

Sampling and assay procedures. Hemolymph samples were taken at 0°C. Several insects were necessary to obtain a 100 μl sample, according to the technique already described (Lequellec *et al.*, 1982).

The analysis of trehalose, in these samples, was carried out by quantitative gas chromatography, as we have already described (Moreau *et al.*, 1982).

The total insect brain was surgically dissected, washed in saline, rinsed and frozen in liquid nitrogen. All sample assays were composed of 50 pooled brains. The determination of trehalase activity requires 4 to 6 samples for each day of development studied. Brain tissues were placed in 500 μl of Britton and Robinson buffer (H_3PO_4: 34.89 mM; CH_3COOH: 40 mM; BO_3H_3: 40.1 mM) and sonicated at the appropriate pH 6.3, using a Branson Sonifer cell Disruptor at 50 W. Following sonication, the homogenate was ultracentrifuged at 12,000 *g* for 30 min at 4°C.

Trehalase activity was measured on the supernatants by monitoring the release of glucose from trehalose as specific substrate. The reaction was conducted in a medium consisting of 900 μl Britton and Robinson buffer pH 6.3 with trehalose 28 mM and 100 μl of enzyme extract. The pH of the buffer was optimal for brain trehalase activity in *Pieris* (Puiroux, unpublished data). Incubation was carried out at 40°C for 120 min. The enzymatic reaction was stopped by heating the tubes at 100°C for 5 min. Under these conditions the hydrolysis of trehalose to glucose was found to be linear with protein concentration and with incubation time.

The amount of glucose released by the enzymatic reactions was estimated after dialysis and ferricyanide reduction by an Autoanalyzer TECHNICON apparatus.

Protein concentrations being determined by the method of Bradford (1976) using a commercial reagent kit (Bio Rad Laboratories Corp. Mannheim RFA).

Data expression. Trehalase activity was expressed in nmol of glucose released in 1 hr by 1 mg protein of extract. Trehalose levels were expressed in nM. Statistical significances between groups were estimated by the Student's *t*-test.

RESULTS

Brain trehalose specific activity

Non-diapausing insects (*Fig. 1*). In the fifth and last larval instar (Lv), we observed a relatively high brain trehalase activity (about 8000 nmol glucose/hr/mg of protein one day after last larval moult). These values increased gradually during the active feeding phase (Lv2, Lv3), but then, when the obligatory feeding phase terminated brain trehalase activity rapidly fell just before the pupal stage (−31% at Lv5).

At the beginning of pupal life, brain trehalase activity was half of the maximum value observed in the larvae. After a long stable period which lasted until the eighth day of pupal life (P8), brain trehalase activity increased again towards emergence. In the young imago, in which the cerebral mass was 30 times greater than in the larval stage, trehalase activity again reached high values.

Diapausing insects (*Fig. 2*). From the last larval instar, a clear difference between non-diapausing and diapausing insects was observed. Just after the last larval moult (Lv1) brain trehalase activity was significantly lower in diapausing larvae (cf. Figs 1 and 2). Then, an opposite evolution in brain trehalase activity can be observed in the two types of insects. Non-diapausing larvae, after a maximum at Lv3 showed a constant decrease in brain trehalase activity. In contrast, the enzyme maintained a high specific activity until the end of larval life (Lv6) of diapausing insects.

At the beginning of the pupal diapause, a gradual decrease in brain trehalase activity was observed and which became very low at P10. This evolution was very different from that mentioned above in non-diapausing pupae.

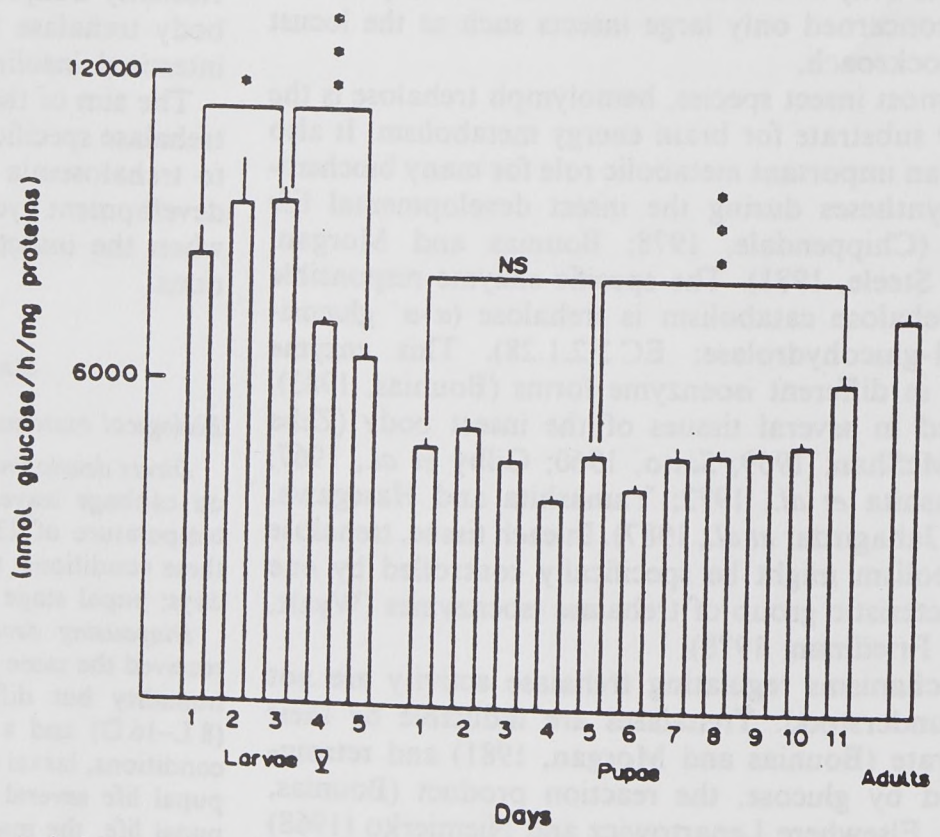


Fig. 1. Brain trehalase activity in non-diapausing insects. Results are the mean of 32 measurements ± S.E.M. NS: not significant. $^{*}p < 0.05$. $^{***}p < 0.001$.

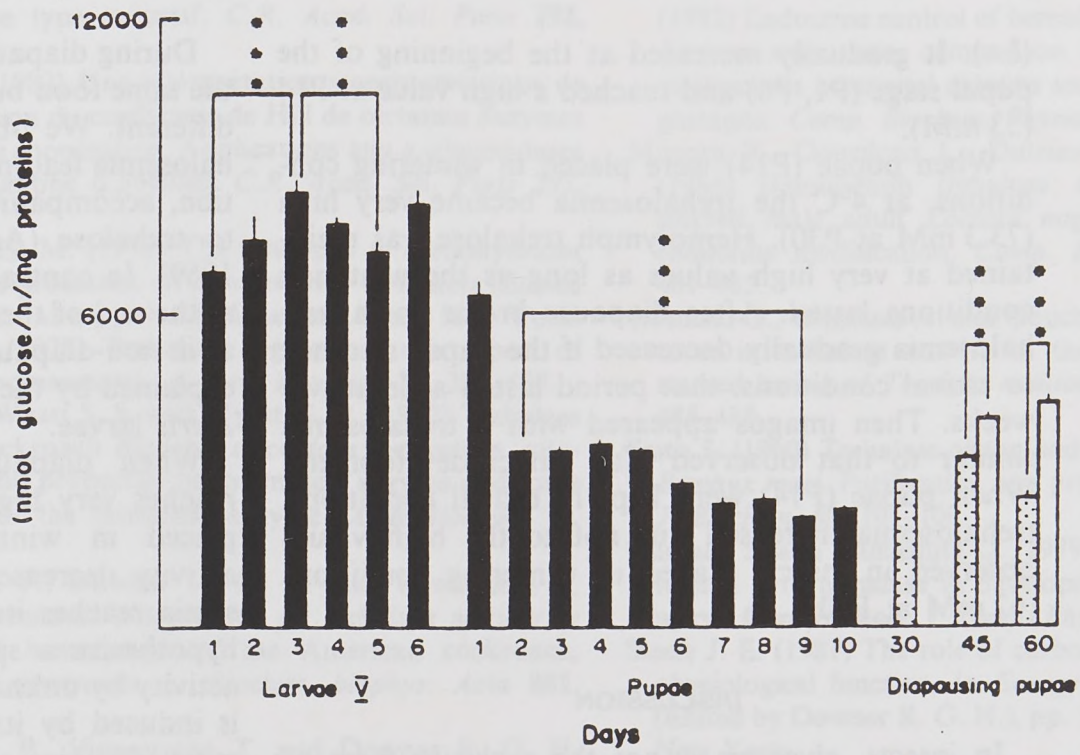


Fig. 2. Brain trehalase activity in diapausing insects. Results are the mean of 32 measurements ± S.E.M. ■, Insects in diapausing conditions (8 L/16 D–17°C). ⊡, Batches of insects maintained in estival conditions (16 L/8 D–22°C). □, Batches of insects placed in wintering conditions (8 L/16 D–4°C). $^{***}p < 0.001$.

When diapausing pupae were placed in wintering conditions at P14 for a long time, brain trehalase activity remained very low for several weeks. However, if the cold period lasted more than 40 days, it was possible to observe some recovery of activity in brain trehalase at P60.

After this long cold period, diapausing insects pupae were put back in estival conditions. Two weeks later, 70% of them were able to give rise to adults with a similar brain trehalase activity to that found in imagos coming from non diapausing development.

In diapausing pupae which never underwent cold action but remained under estival conditions, brain trehalase activity stayed at very low levels for several months. Ninety percent died after dessication and surviving pupae gave rise to adults at long intervals.

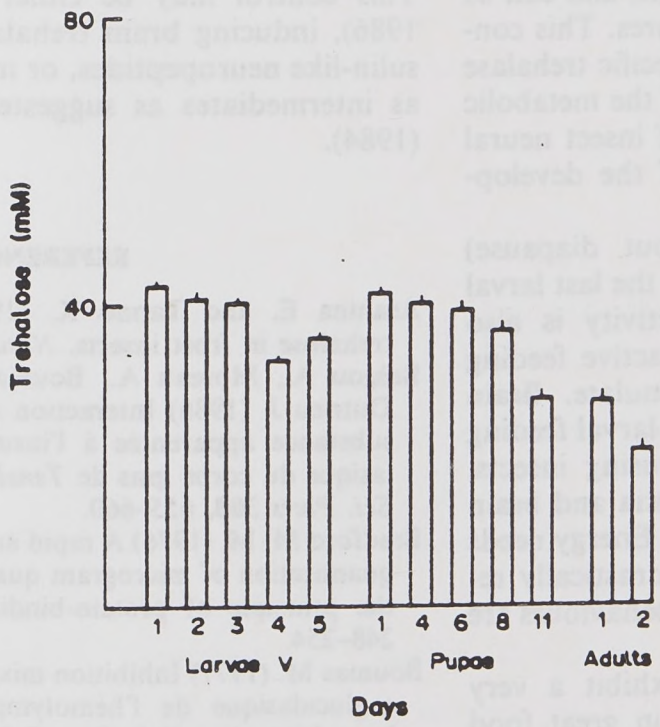


Fig. 3. Hemolymph trehalose in non-diapausing insects. Results are the mean of 8 measurements ± S.E.M.

Hemolymph trehalose

Non-diapausing insects (*Fig. 3*). During the last larval instar (Lv), hemolymph trehalose levels were relatively high, the maximum being observed at the end of the last larval instar. At the beginning of the pupal stage, trehalosemia reached its maximum values (41.8 mM). Then, it gradually decreased towards imago emergence. When imago appeared hemolymph trehalose was already very low, and during further adult life, it continuously decreased.

Diapausing insects (*Fig. 4*). Hemolymph trehalose was relatively high in the last diapausing larval instar

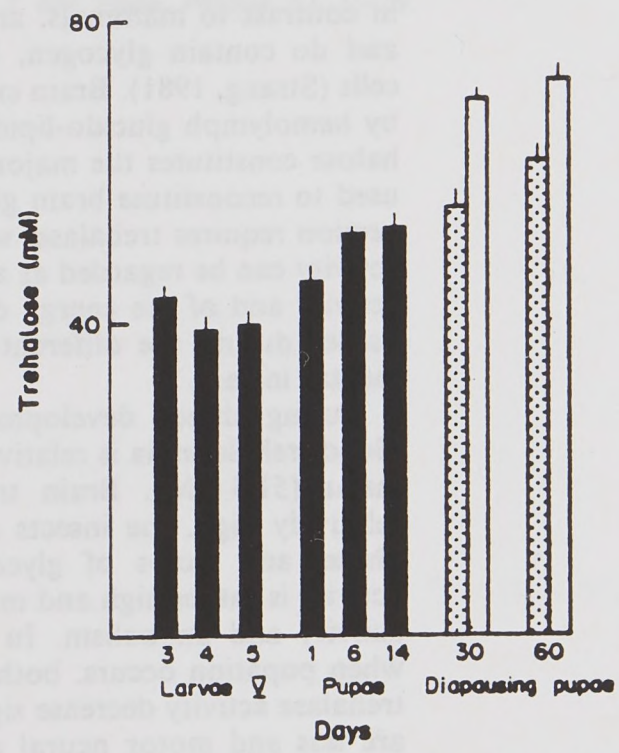


Fig. 4. Hemolymph trehalose in diapausing insects. Results are the mean of 8 measurements ± S.E.M. ■, Insects in diapausing conditions (8 L/16 D–17°C). ⊡, Batches of insects maintained in estival conditions, (16 L/8 D–22°C). □, Batches of insects placed in wintering conditions (8 L/16 D–4°C).

(Lv). It gradually increased at the beginning of the pupal stage (P1, P6) and reached a high value at P14 (53 mM).

When pupae (P14) were placed in wintering conditions, at 4°C the trehalosemia became very high (73.3 mM at P30). Hemolymph trehalose was maintained at very high values as long as the wintering conditions lasted. After diapause broke down, trehalosemia gradually decreased if the pupae returned to estival conditions; that period lasted at least two weeks. Then imagos appeared with a trehalosemia similar to that observed after direct development. When pupae (P14) were kept in estival conditions, trehalosemia increased but not to the high values observed in insects placed in wintering conditions (62 mM at P60).

DISCUSSION

In insects, glycogen is not the exclusive form of sugar stores. Instead, trehalose is the major constituent of hemolymph carbohydrates and is distributed to all tissues. This allows a good distribution of energy substrate to each part of the insect body, in spite of a primitive hemolymph circulating system. Trehalose utilization is governed by specific hydrolases, the trehalases. It is well known that, during the life cycle of insect, trehalosemia undergoes important variations (Wyatt, 1967; Steele, 1981; Moreau, 1973; Moreau *et al.*, 1984). Then, we may suppose that tissue trehalase specific activities constitute a good index of the energy needs for each insect organ during different phases of the developmental life cycle.

In *Pieris brassicae* brain tissue mass constitutes a very small part of the larval body (between 0.0008 to 0.001% of body weight). Following metamorphosis, this proportion reaches close to 1% in the imago (Puiroux, unpublished data). Brain tissues in insects, in contrast to mammals, are richer in carbohydrate and do contain glycogen, localized mainly in glial cells (Strang, 1981). Brain energy is steadily provided by hemolymph glucido-lipidic sources, in which trehalose constitutes the major component, and can be used to reconstitute brain glycogen stores. This conversion requires trehalase, so brain specific trehalase activity can be regarded as an index of the metabolic activity and of the energy demands of insect neural tissues during the different phases of the developmental instars.

During direct development (without diapause) blood trehalosemia is relatively high in the last larval instar (51.5 mM). Brain trehalase activity is also relatively high, the insects are in an active feeding phase, and stores of glycogen accumulate. Brain activity is rather high and mediates the larval feeding activity and anabolism. In non-diapausing insects, when pupation occurs, both trehalosemia and brain trehalase activity decrease significantly. Energy needs are less and motor neural activity is drastically reduced, because nutritional and related behaviours are arrested.

At adult emergence, the insects exhibit a very high motor activity and do not take in great food quantities. In this case, we observe a large decrease in trehalosemia, accompanied by a very high brain trehalase activity (8000 nmol glucose/hr/mg prot).

During diapausing development the insects receive the same food but the abiotic breeding conditions are different. We observe a large increase of blood trehalosemia leading to a very high trehalose accumulation, accompanied by conversion of tissue glycogen to trehalose (Asahina and Tanno, 1964; Moreau, 1969). In contrast, brain trehalase activity decreases at the end of the last larval instars but not so rapidly as in non-diapausing insect larvae. This can be easily explained by the longer feeding period in diapausing *Pieris* larvae.

When diapausing pupae appear, trehalosemia reaches very high levels (72 mM). If the pupae are placed in wintering conditions, brain trehalase activity decreases and becomes very low. Trehalosemia reaches its maximal value (76 mM). We thus hypothesize a specific inhibition in brain trehalase activity by unknown factors since trehalase synthesis is induced by its substrate during normal development (Bounias and Morgan, 1981).

If the insect diapausing pupae are placed in estival conditions, brain trehalase activity decreases as in wintering conditions but the fall of trehalosemia is not as great; most of the diapausing pupae, submitted to estivating conditions, died after a period of a few months due to dessication.

The diapausing pupae placed in wintering conditions, after a two months period, maintain very high levels of trehalosemia and hemolymph trehalase activity is very low (Moreau *et al.*, 1984). However, brain trehalase activity increases progressively during the cold period. This phenomenon is most important since it constitutes the first sign that diapause is breaking. This finding may have significant agronomic importance, since it could be a useful indicator to forecast adult emergence in wild populations.

The reactivation of brain trehalase activity in diapausing pupae is induced by long wintering conditions, which allowed the progressive appearance of different neural activating factors. Cold action may be direct on brain trehalase or, more probably, brain trehalase activity may be under hormonal control. This control may be either direct (Bahjou *et al.*, 1986), inducing brain trehalase activity through insulin-like neuropeptides, or indirect, using bioamines as intermediates as suggested by Jahagirdar *et al.* (1984).

REFERENCES

Asahina E. and Tanno K. (1964) A large amount of trehalose in frost insects. *Nature* **204**, 1222.

Bahjou A., Moreau A., Bounias M., Gourdoux L. and Dutrieu J. (1986) Interaction moléculaire in vitro d'une substance apparentée à l'insuline avec l'activité tréhalasique du corps gras de *Tenebrio molitor L. C.R. Acad. Sci. Paris* **303**, 655–660.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248–254.

Bounias M. (1977) Inhibition mixte de type "n" de l'activité α-glucidasique de l'hémolymphe par le glucose chez la prénymphe d'abeille. *C.R. Acad. Sci. Paris* **285**, 1263–1266.

Bounias M. and Morgan M. R. J. (1981) Adaptation de l'activité des tréhalases de l'hémolymphe d'abeilles aux

variations de la tréhalosémie in vivo: un mécanisme apparent de type inductif. *C.R. Acad. Sci. Paris* **292**, 1199–1202.

Bounias M. (1983) Une interprétation stoechiométrique de la signification du coefficient de Hill de certaines enzymes de cinétique coopérative. Applications aux α-glucosidases de l'hémolymphe d'abeilles. *C.R. Acad. Sci. Paris* **297**, 583–588.

Chippendale G. M. (1978) The functions of carbohydrates in insect life processes. In *Biochemistry of Insects* (Edited by Rockstein M.), pp. 1–55. Academic Press, New York.

Friedman S. (1978) Trehalose regulation, one aspect of metabolic homeostasis. *A. Rev. Entomol.* **23**, 389–407.

Gilby A. R., Wyatt S. S. and Wyatt G. R. (1967) Trehalase from the cockroach *Blaberus discoidalis*: activation, solubilization and properties of the muscle enzyme and some properties of the intestinal enzyme. *Acta Biochim.* **14**, 83–100.

Jahagirdar A. P., Downer R. G. H. and Viswanatha T. (1984) Influence of octopamine on trehalase activity in muscle and hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana L. Biochim. biophys. Acta* **801**, 177–183.

Jahagirdar A. P., Viswanatha T. and Downer R. G. H. (1987) Trehalose-hydrolysing activities in thoracic musculature of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Can. J. Zool.* **65**, 2619–2622.

Lenartowicz E. and Niemierko S. (1968) The effect of low temperature and starvation on carbohydrate metabolism in larvae of *Galleria mellonella L. J. Insect Physiol.* **14**, 451–462.

Lequellec Y., Gourdoux L., Moreau R. and Dutrieu J. (1982) Régulation endocrinienne de la tréhalosémie chez *Locusta migratoria*: comparaison des effets de deux extraits hormonaux endogènes avec ceux de l'insuline et du glucagon. *C. R. Acad. Sci. Paris* **294**, 375–378.

Moreau R. (1969) Observation sur les variations du taux de tréhalose au cours du développement direct et de la diapause chez *Pieris brassicae L. C.R. Acad. Sci. Paris* **268**, 1441–1444.

Moreau R. (1973) Recherches sur quelques aspects des phénomènes physiques métaboliques et physiologiques qui accompagnent ou conditionnent l'expansion des ailes des lépidoptères. Thèse Doctorat d'Etat. *CNRS AO*, 8458.

Moreau R., Gourdoux L., Lequellec Y. and Dutrieu J. (1982) Endocrine control of hemolymph carbohydrates in *Locusta migratoria*: comparison between effects of two endogenous hormonal extracts and effects of insulin and glucagon. *Comp. Biochem. Physiol.* **73A**, 669–673.

Moreau R., Gourdoux L., Dutrieu J. and Ben Khay A. (1984) Hemolymph trehalose and carbohydrates in starved male adult *Locusta migratoria*: possibility of endocrine modification. *Comp. Biochem. Physiol.* **78A**, 481–485.

Rosinski G., Wazeszcz A. and Obuchowicz L. (1979) Differences in trehalase activity in the intestine of fed and starved larvae of *Tenebrio molitor L. Insect Biochem.* **9**, 485–488.

Saito S. (1960) Trehalase of the body fluid of the silkworm *Bombyx mori*. Purification and properties of the enzyme. *J. Biochem.* **48**, 101–109.

Shimada S. and Yamashita O. (1979) Trehalose absorption related with trehalase in developing ovaries of the silkworm *Bombyx mori*. *J. comp. Physiol.* **131**, 333–339.

Steele J. E. (1981) The role of carbohydrate metabolism in physiological function. In *Energy Metabolism in Insects* (Edited by Downer R. G. H.), pp. 101–133. Plenum Press, New York.

Strang R. H. C. (1981) Energy metabolism in the insect nervous system. In *Energy Metabolism in Insects* (Edited by Downer R. G. H.), pp. 169–206. Plenum Press, New York.

Wyatt R. G. (1967) The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol.* **4**, 287–360.

Yamashita O. and Hasegawa K. (1976) Diapause hormone action in silkworm ovaries incubated *in vitro*: ^{14}C-trehalose incorporation in glycogen. *J. Insect Physiol.* **22**, 409–414.

Yamashita O., Hasegawa K. and Seki M. (1972) Effect of the diapause hormone on trehalase activity in pupal ovaries of the silkworm *Bombyx mori L. Gen. comp. Endocr.* **18**, 515–525.

Yamashita O., Yaginuma T. and Hasagawa K. (1981) Hormonal and metabolic control of egg diapause of the silkworm *Bombyx mori* (*Lepidoptera, Bombycidae*). *Ent. Gen.* **7**, 195–211.

Zebe E. C. and McShan W. H. (1959) Trehalase in the thoracic muscles of the cockroach *Leucophea madera*. *J. cell. comp. Physiol.* **53**, 21–59.

N° d'ordre : 383

52

T H È S E

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : NEUROSCIENCES

PAR

Jacques PUIROUX

DIAPAUSE ET ACTIVITES SECRETOIRES ET METABOLIQUES DU CERVEAU CHEZ LA PIERIDE DU CHOU.

---

soutenue le **24 Novembre 1989** *devant la commission d'examen :*

M. M. **MOULINS**, Professeur ..... **Président**

Mme **J. GIRARDIE**, Directeur de recherche au CNRS BORDEAUX I .....
M. M. **BOUNIAS**, Directeur de recherche INRA AVIGNON .....
M. J. **CLARET**, Chargé de recherche au CNRS ORSAY JOSAS .....
M. R. **MOREAU**, Maître de conférences BORDEAUX I ..... **Examinateurs**

- 1989 -

RESUME

Chez la piéride du chou, le cerveau perçoit directement les variations de la photopériode et détermine le type de développement, direct ou diapausant, en fonction de celles-ci. Au cours de la fin de l'ontogenèse en développement direct, nous avons constaté d'importantes modifications anatomiques et histologiques du système nerveux central. Par contre, la diapause nymphale s'accompagne rapidement d'une baisse d'activité du système nerveux, se traduisant par un blocage des transformations morphogénétiques et par un fort ralentissement de la libération des produits de neurosécrétion. Ce dernier phénomène conduit à un accroissement temporaire de la charge des cellules neurosécrétrices peptidergiques basophiles qui sont à la base de la régulation neuroendocrinienne des processus de développement. Une analyse en HPLC couplée à un détecteur électrochimique a permis de montrer une accumulation de dopamine dans le cerveau des insectes en diapause. L'emploi d'anticorps anti-dopamine a révélé que cette amine était localisée dans certaines des cellules basophiles.

La fourniture énergétique d'origine glucidique au cerveau des piérides dépend essentiellement de l'activité d'une glucosidase : la tréhalase. ~~La preuve que~~ Cette enzyme pour spécifique du tissu nerveux, ~~est apportée~~ car elle diffère par sa masse moléculaire et par ses propriétés biochimiques des tréhalases des autres tissus de l'insecte. L'activité de cette enzyme varie en fonction des stades du développement et de l'action de certaines hormones. Elle s'effondre au cours de la diapause nymphale, sans toutefois disparaître. Une action prolongée du froid (60 jours à 4°C), permet la reprise de l'activité de la tréhalase cérébrale. L'étude conjointe de la mobilisation des stocks cérébraux de glycogène, représentant l'autre source glucidique quantitativement importante, a rendu possible l'établissement du bilan global des besoins énergétiques du cerveau de la piéride au cours de la fin de l'ontogenèse nous permettant d'estimer ainsi les variations d'activité cérébrale pendant cette période.

SOMMAIRE

pages

INTRODUCTION 1

MATERIEL ET METHODES 6

1 MATERIEL BIOLOGIQUE 6

1-1 Ecologie de la piéride du chou 6

1-2 Elevage de la piéride du chou 6

1-2-1 développement continu 6

1-2-2 développement diapausant 7

2 METHODES 9

2-1 Dissections 9

2-1-1 larves 9

2-1-2 nymphes 9

2-2 Histologie et cytologie 10

2-2-1 coloration à l'hémalun-érythrosine 10

2-2-2 coloration au bleu Victoria-fuchsine paraldéhyde 10

2-2-2-1 coloration de coupes de cerveau 10

2-2-2-2 coloration de cerveaux *in toto* 11

2-2-3 coloration à l'acide periodique-réactif de Schiff (APS) 11

2-2-4 immunohistofluorescence 11

2-2-4-1 principe 11

2-2-4-2 mode opératoire 12

2-2-4-2-1 anticorps anti insuline 12

2-2-4-2-2 anticorps anti amine 12

2-2-6 microscopie électronique 13

2-3 Méthodes biochimiques 14

2-3-1 dosage des protéines et pesée de cerveaux 14

2-3-2 activité tréhalasique 14

2-3-2-1 principe 14

2-3-2-2 extraction de la fraction enzymatique 14

2-3-2-3 réaction enzymatique 15

2-3-2-4 dosage du glucose 15

2-3-2-5 expression des résultats 16

2-3-3 mesure du glycogène cérébral 16

2-3-4 la phosphorylase 17

2-3-4-1 principe 17

2-3-4-2 mode opératoire 17

2-3-4-2-1 prélèvement-extraction 17

2-3-4-2-2 activité enzymatique 18

2-3-4-2-3 dosage du phosphate inorganique 19

2-4 Méthodes chromatographiques 20

2-4-1 purification de la tréhalase 20

2-4-1-1 extraits tissulaires 20

2-4-1-2 chromatographie sur colonne 20

2-4-1-3 identification et masse moléculaire de la tréhalase 21
2-4-1-4 appréciation du degré de purification 21
2-4-2 analyse des amines biogènes cérébrales 21
2-4-2-1 chromatographie en phase inverse 22
2-4-2-2 électrodétection 22
2-4-2-3 mode opératoire 22
2-4-2-3-1 préparation des échantillons 22
2-4-2-3-2 système HPLC 23
2-4-2-3-3 système de détection 24
2-4-2-3-4 exploitation des résultats 24

2-5 Expression des résultats 25

RESULTATS

CHAPITRE I

1 ETUDE DES VARIATIONS ANATOMO-HISTOLOGIQUES DU CERVEAU DE LA PIERIDE DU CHOU 27

1-1 Introduction 27
1-2 Etude anatomique 28
Larves♀ 29
Prénymphes 29
Nymphes 29
1-3 Etude histologique 30
Larves♀ 30
Prénymphes 30
Nymphes 30
1-4 Masse et protéines cérébrales 31
1-4-1 masse cérébrale 32
Larves♀ 32
Nymphes 34
1-4-2 protéines cérébrales 37
Larves♀ 37
Nymphes 39
1-5 Conclusions 42
1-6 Discussion 42
1-6-1 anatomo-histologie 42
1-6-2 masse et protéines cérébrales 45

2 ACTIVITE NEUROSECRETRICE CEREBRALE 47

2-1 Introduction 47
2-2 Coloration *in toto* 48
Larves♀ 48
Nymphes 49
2-3 Coloration de cerveau sur coupe 50
Larves♀ 50
Nymphes 51

2-4 Conclusions 52
2-5 Présence d'un facteur insulinoïde 53
2-5-1 Immunohistofluorescence 53
2-5-2 Dosages radioimmunologiques 53
2-6 Discussion 54

CHAPITRE II
LES BIOAMINES CEREBRALES

1 Introduction 59
2 Mesures des quantités de bioamines cérébrales 61
2-1 Mise au point du système HPLC 61
2-2 Résultats des mesures 64
2-2-1 larves V 65
développement continu 65
développement diapausant 67
conclusion 69
2-2-2 nymphes 70
développement continu 70
développement diapausant 71
-début de diapause 71
-plus tardivement dans la diapause 73
conclusion 76
2-2-3 effets de la lumière et de la température 77
3 Localisation de la dopamine et de la sérotonine 78
3-1 Localisation de la dopamine 79
3-2 Localisation de la sérotonine 79
3-3 Détermination du type cellulaire 80
3-4 Conclusion 80
4 Discussion 81

CHAPITRE III
METABOLISME GLUCIDIQUE DU CERVEAU

1 Introduction 87
2 Tréhalase cérébrale 90
2-1 Purification, masse moléculaire et caractérisation 90
2-1-1 masse moléculaire de la tréhalase cérébrale 90
2-1-2 masse moléculaire de la tréhalase musculaire 90
2-1-3 purification sur gel d'électrophorèse 92
2-1-4 pH optimum de la tréhalase cérébrale 94
2-1-5 constante de Michaelis de la tréhalase cérébrale 94
larves 95
nymphes 96
2-1-6 conclusions 97
2-2 Activité tréhalasique cérébrale 97
2-2-1 au cours du développement 97
2-2-1-1 larves V 97
2-2-1-2 nymphes 100
2-2-2 effets des conditions thermiques imposées pendant la diapause 102
2-2-3 effet du jeûne 104

2-2-4 action des hormones et des neurohormones sur l'activité tréhalasique cérébrale 105
larves V 106
nymphes 108
2-2-5 conclusions 109

3 Glycogène cérébral et glycogène-phosphorylase 110
3-1 Localisation du glycogène cérébral 110
3-1-1 localisation histologique 110
larves V 110
nymphes 111
3-1-2 localisation cytologique 111
3-2 Teneurs en glycogène du tissu cérébral et activité de la glycogène-phosphorylase 112
3-2-1 larves V 112
3-2-1-1 quantités de glycogène du tissu cérébral pendant le dernier stade larvaire 112
3-2-1-2 pourcentage du glycogène en fonction du poids frais du cerveau 114
3-2-1-3 effets du jeûne sur les quantités de glycogène cérébral 117
3-2-1-4 activité de la glycogène-phosphorylase 118
3-2-2 nymphes 121
3-2-2-1 quantités de glycogène du tissu cérébral pendant la vie nymphale 121
3-2-2-2 pourcentage du glycogène en fonction du poids frais du cerveau 123
3-2-2-3 variations des quantités de glycogène cérébral pendant le séjour de diapause : effets des conditions thermiques 126
3-2-2-4 activité de la glycogène-phosphorylase 127
3-2-3 conclusions 130

4 Discussion 131

CONCLUSION GENERALE 137

BIBLIOGRAPHIE 144

TABLE DES ILLUSTRATIONS 158

LISTE DES PUBLICATIONS 164

SOMMAIRE

IV-3 - Stabilité des α-glucosidases de l'hémolymphe de larves d'abeilles placées hors de leurs alvéoles

Collaboration avec la Yougoslavie
Dépt de Biologie, Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Belgrade (Prof. Popeskovič)

Ce travail fait partie du travail de thèse Ph.D. de Mme M. Debevec, suite à des stages sabbatiques, dans le cadre d'une collaboration permanente mise en oeuvre depuis 1980. (Rédaction en phase finale)
NB - La soutenance, prévue début 1990, sera retardée par le départ de l'intéressée pour l'Irak, pour raisons familiales -

Ces recherches sont destinées à ouvrir la voie à de futures études toxicologiques, en permettant de situer les limites de l'homéostasie biochimique -

59

C. R. Soc. Biol., 1989, *183*, 130-138.

Biochimie comparée.

Propriétés cinétiques des α-glucosidases de l'hémolymphe, en relation avec la glycémie, chez les larves d'abeilles du 5e stade conservées hors de leurs alvéoles jusqu'à l'agonie

par MIRJANA DEBEVEC *, DRAGUTIN POPESKOVIC *
et MICHEL BOUNIAS **

* *University of Beograd, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biology, P. O. Box 370, 11000 Beograd, Yugoslavia,*
** *Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, B. P. 91, 84140 Montfavet, France.*

(reçue le 13 juin 1989).

Summary. — Honeybees larvae at the Vth instar were kept out from the brood combs, at 7° C and 20° C in glass dishes for up to 5 days, in order to study the stability of haemolymph α-glucosidases as a potential toxicological index for pesticide action. An increase of the maximum velocity was observed after 6 hr at 20° C and 7° C and from 120 hr to 144 hr at 7° C. The highest values (~ 300 %) were observed at agony stages. By contrast, an intermediary decrease was noted after 1 hr at 7° C, 3 hr at 7° C and 20° C then 24 and 96 hr at 7° C. The sole changes obtained for the values of the dissociation constant, were a slight decrease at 24 hr, 96 hr and 144 hr (agony) at 7° C. The Hill coefficients remained stable near n = 1, except after 3 hr and 6 hr at 7° C where a significant decrease occurred. Although a molecular activation by an unknown factor, likely hormonal, cannot be excluded, at intermediate stages, the most important modifications observed at agony are consistent with the hypothesis of a reserve-enzyme release from cellular compartments, for instance mitochondrial granules, which are likely broken during the lytic agony processes. These data are in agreement with the previously described release of glucose at the expense of trehalose, at the same stages.

Résumé. — Des larves d'abeilles du 5e stade ont été conservées hors de leurs alvéoles, à 7° C et à 20° C, dans des récipients de verre, en vue de l'étude de la stabilité des α-glucosidases de l'hémolymphe comme indice potentiel de l'action toxique de pesticides. Une augmentation de la vitesse maximale a été observée après 6 h à 20° C et 7° C et de 120 à 144 h à 7° C. Les plus fortes valeurs (~ 300 %) ont été observées au stade d'agonie. En revanche, une diminution transitoire a été notée après 1 h à 7° C, 3 h à 7° C, puis 24 h et 96 h à 7° C. Les seules modifications obtenues de la

constante de dissociation ont été une légère diminution à 24 h, 96 h et 144 h (agonie) à 7° C. Les coefficients de Hill sont restés stables, au voisinage de n = 1, excepté au bout de 3 h et 6 h à 7° C où leurs valeurs ont diminué. Bien qu'une activation moléculaire par un facteur inconnu, vraisemblablement hormonal, ne puisse être exclue à certains stades intermédiaires, les modifications les plus importantes, observées à l'agonie, concordent avec l'hypothèse de la libération d'une réserve d'enzyme à partir de compartiments cellulaires, par exemple, mitochondriaux, qui sont vraisemblablement lésés au cours des processus lytiques associés à l'agonie.

Les données concordent également avec la libération de glucose au détriment de celle du tréhalose, précédemment décrite aux mêmes stades.

L'emploi de pesticides de synthèse, à l'intérieur même des ruches, pour la lutte contre le parasite *Varroa jacobsoni* (Acariens) entraîne des risques de toxicité, non seulement vis-à-vis des adultes, mais également du couvain et tout particulièrement des larves non encore operculées. Or, les études de toxicologie sur les larves sont très difficiles à conduire *in situ*, c'est-à-dire à l'intérieur des ruches. Des études de mortalité sous l'action de composés herbicides ont été décrites (1), mais les recherches sont alors considérablement alourdies par les difficultés du nourrissement qui peuvent en outre entraîner une variabilité biochimique telle que celle qui a été déjà observée chez les adultes naissantes (2) du fait de certains mécanismes particuliers de régulation.

Il paraissait donc utile d'analyser certains paramètres biochimiques susceptibles de constituer des indices toxicologiques chez des larves ayant cessé de se nourrir, soit du 5e stade, et conservées dans des conditions de laboratoire plus favorables à l'expérimentation que le maintien à l'intérieur de la ruche.

Au cours de précédentes recherches (3), il est apparu qu'un accroissement de la glucosémie se produisait au détriment de la tréhalosémie chez les larves conservées en récipient de verre, à 7° C, à partir de 96 h et jusqu'au stade d'agonie (120 à 144 h) où le phénomène atteint son maximum d'intensité. Il paraissait donc important de vérifier si la cause de ces variations ne pouvait se trouver dans un accroissement d'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe.

Le but du présent travail était donc l'analyse des propriétés cinétiques des α-glucosidases, de manière à permettre une identification aussi précise que possible des phénomènes mis en jeu.

Animaux et techniques. — Les larves d'abeilles ouvrières (*Apis mellifera mellifera* L.) du 5e stade sont encore en position transversale et occupent la totalité du volume de l'alvéole. Elles sont extraites à l'aide de pinces souples, puis disposées par groupe de 5 dans des boîtes de Petri en verre, de ∅ 5 cm, et placées, à l'obscurité, à 20° C et à 7° C (± 1° C). L'opération est rendue délicate par l'extrême fragilité des larves. Aux temps déterminés, soit au bout de 1 h, 3 h, 6 h, 24 h, 96 h, 120 h et 144 h, selon les conditions de température, l'hémolymphe de 5 abeilles est prélevée

à l'aide de microseringues Hamilton, et une fraction aliquote est immédiatement placée à 4° C en vue des analyses enzymatiques, une autre étant destinée à la détermination de la glycémie (3). Les cinétiques sont tracées en continu par mesure d'absorbance à 410 nm après formation de para-nitro-phénol à partir du para-nitro-phényl-phosphate utilisé comme substrat chromogène spécifique. L'appareil utilisé est un photomètre Vernon PHI-5. Les cuves contiennent un volume de 200 µl et toute la surface occupée par le liquide est balayée par le faisceau lumineux. Les cinétiques sont étudiées à pH 6,8 en milieu tampon phosphate 50 mM (concentration finale). Les concentrations en enzyme correspondent à 5 µl d'hémolymphe pour 200 µl de volume réactionnel total. Les paramètres cinétiques sont calculés à partir de l'équation de Hill (4) : $\mathcal{V} = V_M.S^n/(K_s + S^n)$ dans laquelle $\mathcal{V}$ = vitesse initiale; V_M = vitesse maximale; S = concentration en substrat; K_s = constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (ES) soit : $K_s = (E).(S)^n/(ES)$; n = coefficient de Hill. Les vitesses maximales sont calculées à partir de la méthode algébrique rigoureuse précédemment décrite (5) récemment généralisée de la manière suivante (6) : soit $\mathcal{V}_i$ et $\mathcal{V}_j$ les vitesses initiales mesurées pour les concentrations en substrat S_i et S_j telles que $S_i.S_j = S_\gamma^2$, S_γ étant une constante arbitrairement fixée, si :

$$Y = (\mathcal{V}_i^{-1} + \mathcal{V}_j^{-1}) \quad \text{et} \quad X = (\mathcal{V}_i.\mathcal{V}_j)^{-1},$$

alors :

$$Y = V_M X + V_M^{-1}[1 - K_s^2/S_\gamma^{2n}]$$

La valeur de V_M est obtenue par la pente de régression linéaire de Y sur X, et les valeurs de n et de K_s sont tirées des relations :

$$K_s = (V_M/\mathcal{V}_1) - 1 \quad \text{où} \quad \mathcal{V}_1$$

correspond à $S_1 = 1$ mM et $n = L_n[K.\mathcal{V}_i/(V_M\text{-}\mathcal{V}_i)]/L_nS_i$ pour tout couple ($\mathcal{V}_i$, S_i) sauf ($\mathcal{V}_1$, S_1).

Les moyennes sont comparées à l'aide de l'épreuve de « *t* » de Student et les seuils de signification calculés d'après l'équation de distribution de « *t* » sont désignés par P.

Résultats. — Le Tableau I indique les valeurs de V_M, K_s, n et du rapport V_M/K_s (qui constitue un indice global de l'activité enzymatique dans le cas des larves d'aspect normal conservées à 20° C. La Figure 1 présente les cinétiques correspondantes, dans la représentation d'Augustinsson (7). La vitesse maximale est successivement abaissée après 3 h, avec augmentation de la valeur de K_s, et augmentée après 6 h sans modification de K_s. Le coefficient de Hill oscille également en passant d'une valeur supérieure, au bout de 1 h, à une valeur inférieure au bout de 3 h. Il est important de souligner qu'au-delà de 6 h, les larves commen-

TABLEAU I. — Évolution des paramètres cinétiques de l'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves d'abeilles du 5e stade conservées à 20° C.

	V_M µM/mn/µl	K_S mM	n	V_M/K_S
Témoins	7,80 ± 0,08 (N = 2)	3,77 ± 0,08 (N = 2)	0,99 ± 0,05 (N = 4)	2,07
1 h	7,60 ± 0,19 (N = 4)	5,22 ± 0,39 (N = 4)	1,18 ± 0,05 (a) (N = 4)	1,45
3 h	5,61 ± 0,12 (b) (N = 2)	6,49 ± 0,80 (b) (N = 2)	0,84 ± 0,02 (b) (N = 4)	0,86
6 h	9,31 ± 0,18 (b) (N = 2)	4,32 ± 0,20 (N = 2)	0,96 ± 0,03 (N = 4)	2,16

Les moyennes ± les écarts types sont données pour (N) mesures.
Différences significatives : (a) à $P < 0,01$; (b) à $P < 0,05$.

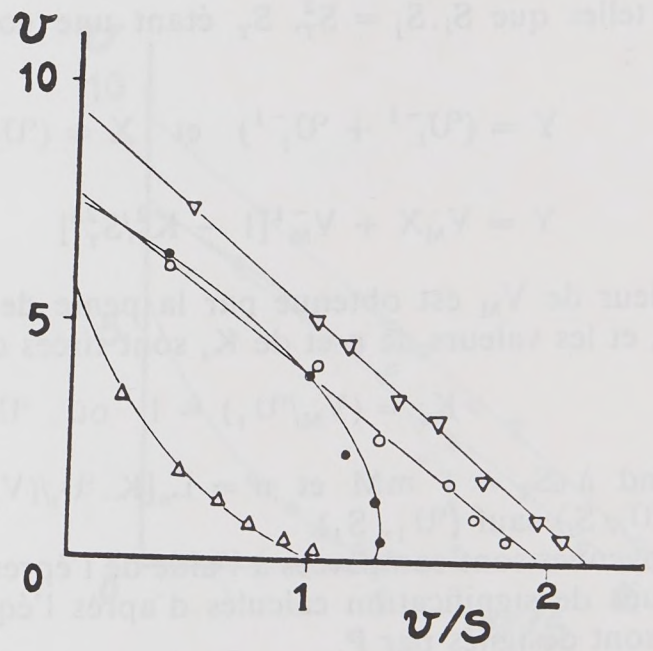


FIG. 1. — Représentation d'Augustinsson des courbes de saturation des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves du 5e stade conservées à 20° C. (○) = témoins; (●) = 1 h ; (Δ) = 6 h. Les valeurs sont la moyenne de 3 répétitions. v = vitesses initiales en µM/mn/µl; S = concentrations en substrat (mM).

cent à présenter des signes d'agonie tels qu'ils ont été décrits antérieurement (8).

Le Tableau II présente les valeurs observées à la température de 7° C : dans ce cas, les larves ont conservé un aspect normal pendant 5 jours (120 h). La Figure 2 présente les cinétiques les plus caractéristiques.

à l'aide de microseringues Hamilton, et une fraction aliquote est immédiatement placée à 4° C en vue des analyses enzymatiques, une autre étant destinée à la détermination de la glycémie (3). Les cinétiques sont tracées en continu par mesure d'absorbance à 410 nm après formation de para-nitro-phénol à partir du para-nitro-phényl-phosphate utilisé comme substrat chromogène spécifique. L'appareil utilisé est un photomètre Vernon PHI-5. Les cuves contiennent un volume de 200 µl et toute la surface occupée par le liquide est balayée par le faisceau lumineux. Les cinétiques sont étudiées à pH 6,8 en milieu tampon phosphate 50 mM (concentration finale). Les concentrations en enzyme correspondent à 5 µl d'hémolymphe pour 200 µl de volume réactionnel total. Les paramètres cinétiques sont calculés à partir de l'équation de Hill (4) : $\mathcal{V} = V_M.S^n/(K_s + S^n)$ dans laquelle $\mathcal{V}$ = vitesse initiale; V_M = vitesse maximale; S = concentration en substrat; K_s = constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (ES) soit : $K_s = (E).(S)^n/(ES)$; n = coefficient de Hill. Les vitesses maximales sont calculées à partir de la méthode algébrique rigoureuse précédemment décrite (5) récemment généralisée de la manière suivante (6) : soit $\mathcal{V}_i$ et $\mathcal{V}_j$ les vitesses initiales mesurées pour les concentrations en substrat S_i et S_j telles que $S_i.S_j = S_\gamma^2$, S_γ étant une constante arbitrairement fixée, si :

$$Y = (\mathcal{V}_i^{-1} + \mathcal{V}_j^{-1}) \quad \text{et} \quad X = (\mathcal{V}_i.\mathcal{V}_j)^{-1},$$

alors :

$$Y = V_M X + V_M^{-1}[1 - K_s^2/S_\gamma^{2n}]$$

La valeur de V_M est obtenue par la pente de régression linéaire de Y sur X, et les valeurs de n et de K_s sont tirées des relations :

$$K_s = (V_M/\mathcal{V}_1) - 1 \quad \text{où} \quad \mathcal{V}_1$$

correspond à $S_1 = 1$ mM et $n = L_n[K.\mathcal{V}_i/(V_M - \mathcal{V}_i)]/L_n S_i$ pour tout couple $(\mathcal{V}_i, S_i)$ sauf $(\mathcal{V}_1, S_1)$.

Les moyennes sont comparées à l'aide de l'épreuve de « *t* » de Student et les seuils de signification calculés d'après l'équation de distribution de « *t* » sont désignés par P.

Résultats. — Le Tableau I indique les valeurs de V_M, K_s, n et du rapport V_M/K_s (qui constitue un indice global de l'activité enzymatique dans le cas des larves d'aspect normal conservées à 20° C. La Figure 1 présente les cinétiques correspondantes, dans la représentation d'Augustinsson (7). La vitesse maximale est successivement abaissée après 3 h, avec augmentation de la valeur de K_s, et augmentée après 6 h sans modification de K_s. Le coefficient de Hill oscille également en passant d'une valeur supérieure, au bout de 1 h, à une valeur inférieure au bout de 3 h. Il est important de souligner qu'au-delà de 6 h, les larves commen-

TABLEAU I. — Évolution des paramètres cinétiques de l'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves d'abeilles du 5e stade conservées à 20° C.

	V_M µM/mn/µl	K_S mM	n	V_M/K_S
Témoins	7,80 ± 0,08 (N = 2)	3,77 ± 0,08 (N = 2)	0,99 ± 0,05 (N = 4)	2,07
1 h	7,60 ± 0,19 (N = 4)	5,22 ± 0,39 (N = 4)	1,18 ± 0,05 (a) (N = 4)	1,45
3 h	5,61 ± 0,12 (b) (N = 2)	6,49 ± 0,80 (b) (N = 2)	0,84 ± 0,02 (b) (N = 4)	0,86
6 h	9,31 ± 0,18 (b) (N = 2)	4,32 ± 0,20 (N = 2)	0,96 ± 0,03 (N = 4)	2,16

Les moyennes ± les écarts types sont données pour (N) mesures.
Différences significatives : (a) à $P < 0,01$; (b) à $P < 0,05$.

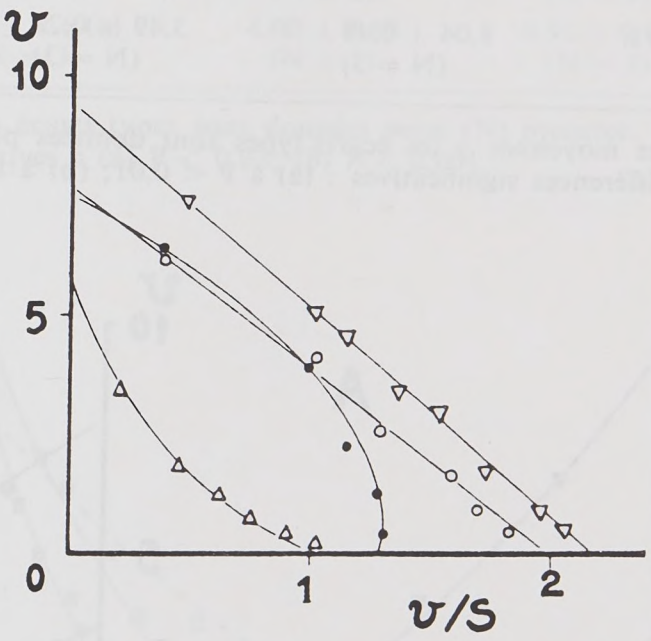


FIG. 1. — Représentation d'Augustinsson des courbes de saturation des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves du 5e stade conservées à 20° C. (○) = témoins; (●) = 1 h ; (Δ) = 6 h. Les valeurs sont la moyenne de 3 répétitions. v = vitesses initiales en µM/mn/µl; S = concentrations en substrat (mM).

cent à présenter des signes d'agonie tels qu'ils ont été décrits antérieurement (8).

Le Tableau II présente les valeurs observées à la température de 7° C : dans ce cas, les larves ont conservé un aspect normal pendant 5 jours (120 h). La Figure 2 présente les cinétiques les plus caractéristiques.

TABLEAU II. — Évolution des paramètres cinétiques de l'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves d'abeilles du 5e stade conservées à 70° C.

	V_M µM/mn/µl	K_S mM	n	V_M/K
Témoins	7,80 ± 0,08 (N = 2)	3,77 ± 0,01 (N = 2)	0,99 ± 0,05 (N = 4)	2,07
1 h	3,41 ± 0,18 (a) (N = 2)	4,14 ± 0,39 (N = 2)	0,93 ± 0,02 (N = 4)	0,82
3 h	2,88 ± 0,13 (a) (N = 2)	3,65 ± 0,25 (N = 2)	0,96 ± 0,04 (N = 4)	0,79
6 h	8,93 ± 0,72 (N = 2)	4,71 ± 0,71 (N = 2)	0,93 ± 0,05 (N = 4)	1,90
24 h	3,47 ± 0,15 (b) (N = 3)	2,34 ± 0,13 (b) (N = 3)	1,10 ± 0,09 (N = 3)	1,48
96 h	3,02 ± 0,15 (b) (N = 3)	2,45 ± 0,18 (b) (N = 3)	1,10 ± 0,07 (N = 3)	1,23
120 h	8,04 ± 0,48 (N = 3)	3,49 ± 0,28 (N = 3)	1,08 ± 0,04 (N = 3)	2,30

Les moyennes ± les écarts types sont données pour (N) mesures.
Différences significatives : (a) à $P < 0,01$; (b) à $P < 0,001$.

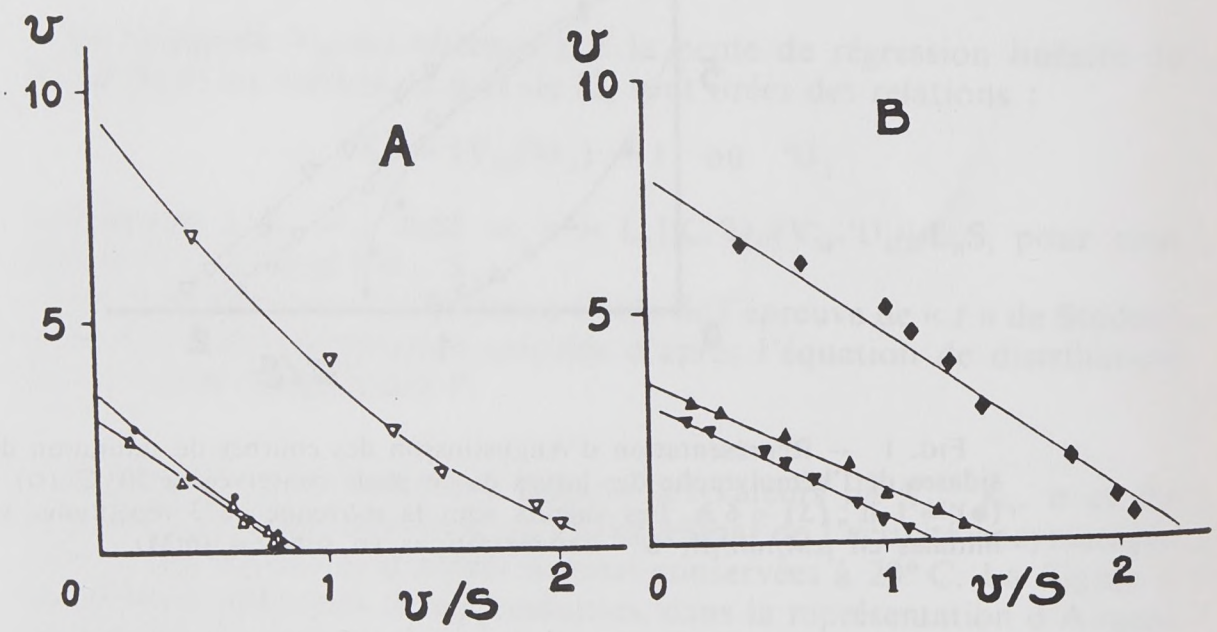


FIG. 2. — Représentations d'Augustinsson des courbes de saturation des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves du 5e stade conservées à 7° C : A = étude à court terme : (●) = 1h ; (Δ) = 3 h; (▽) = 6 h. B = étude à long terme : (▲) = 24 h; (▼) = 96 h; (◆) = 120 h. v = vitesses initiales (µM/mn/µl); S = concentrations en substrat (mM).

Les coefficients de Hill ne sont affectés dans aucun cas de manière significative. Les vitesses maximales diminuent au bout de 1 h et 3 h puis, ainsi que les constantes K_s, au bout de 24 h et 96 h. Le rapport V_M/K_s montre que la perte globale d'activité est plus marquée à 1 h et 3 h, comme elle l'était au bout de 3 h à 20° C.

Les mesures effectuées au stade d'agonie sont indiquées dans le Tableau II, et les cinétiques correspondantes sont illustrées par la Figure 3.

TABLEAU III. — Paramètres cinétiques de l'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves d'abeilles du 5e stade présentant les symptômes de degrés croissants de l'état d'agonie (Agn 1 à 3).

	V_M µM/mn/µl	K_S mM	n	V_M/K_S
Témoins	7,80 ± 0,08 (N = 2)	3,77 ± 0,01 (N = 2)	0,99 ± 0,05 (N = 4)	2,07
Agn 1 (120 h)	18.8 ± 2,7 (a) (N = 2)	3,07 ± 0,46 (N = 2)	0,90 ± 0,12 (N = 3)	6,13
Agn 2 (120 h)	24,5 ± 0,6 (b) (N = 2)	3,09 ± 0,19 (N = 2)	0,97 ± 0,02 (N = 3)	7,96
Agn 3 (144 h)	20,0 ± 2,6 (a) (N = 3)	4,00 ± 0,80 (N = 3)	0,91 ± 0,02 (N = 3)	5,01

Les moyennes ± les écarts types sont données pour (N) mesures.
Différences significatives : (a) $P < 0,02$; (b) $P < 0,001$.

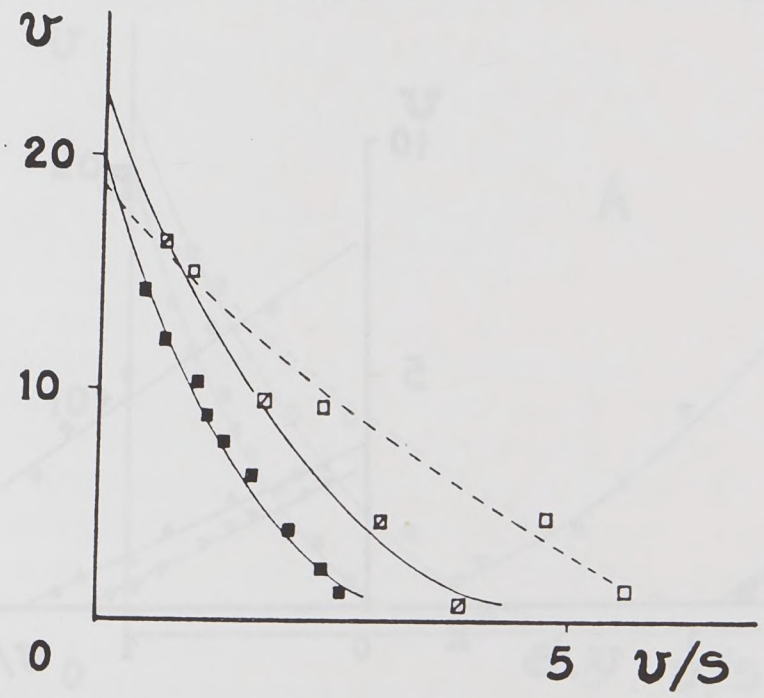


FIG. 3. — Représentations d'Augustinsson des courbes de saturation des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves du 5e stade conservées à 7° C et représentant les symptômes d'agonie. (□) = 1er stade (120 h); [] = 2e stade (120 h); (■) = 3e stade (144 h).

TABLEAU II. — Évolution des paramètres cinétiques de l'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves d'abeilles du 5e stade conservées à 70° C.

	V_M µM/mn/µl	K_S mM	n	V_M/K
Témoins	7,80 ± 0,08 (N = 2)	3,77 ± 0,01 (N = 2)	0,99 ± 0,05 (N = 4)	2,07
1 h	3,41 ± 0,18 (a) (N = 2)	4,14 ± 0,39 (N = 2)	0,93 ± 0,02 (N = 4)	0,82
3 h	2,88 ± 0,13 (a) (N = 2)	3,65 ± 0,25 (N = 2)	0,96 ± 0,04 (N = 4)	0,79
6 h	8,93 ± 0,72 (N = 2)	4,71 ± 0,71 (N = 2)	0,93 ± 0,05 (N = 4)	1,90
24 h	3,47 ± 0,15 (b) (N = 3)	2,34 ± 0,13 (b) (N = 3)	1,10 ± 0,09 (N = 3)	1,48
96 h	3,02 ± 0,15 (b) (N = 3)	2,45 ± 0,18 (b) (N = 3)	1,10 ± 0,07 (N = 3)	1,23
120 h	8,04 ± 0,48 (N = 3)	3,49 ± 0,28 (N = 3)	1,08 ± 0,04 (N = 3)	2,30

Les moyennes ± les écarts types sont données pour (N) mesures.
Différences significatives : (a) à $P < 0,01$; (b) à $P < 0,001$.

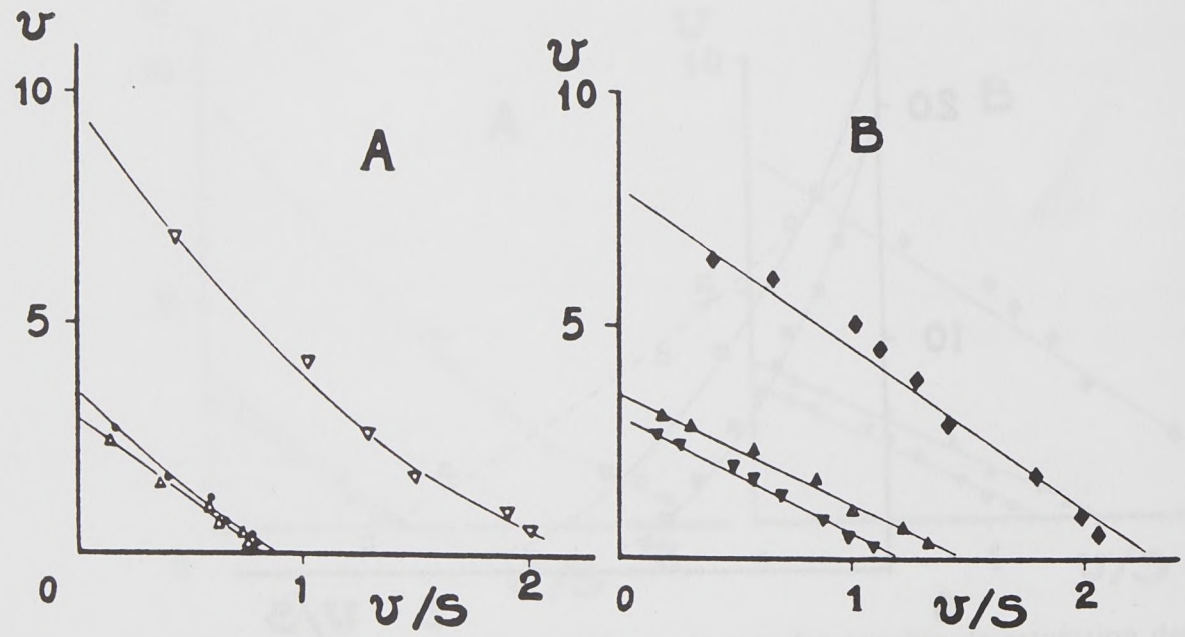


FIG. 2. — Représentations d'Augustinsson des courbes de saturation des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves du 5e stade conservées à 7° C : A = étude à court terme : (●) = 1h ; (Δ) = 3 h; (▽) = 6 h. B = étude à long terme : (▲) = 24 h; (▼) = 96 h; (◆) = 120 h. v = vitesses initiales (µM/mn/µl); S = concentrations en substrat (mM).

Les coefficients de Hill ne sont affectés dans aucun cas de manière significative. Les vitesses maximales diminuent au bout de 1 h et 3 h puis, ainsi que les constantes K_s, au bout de 24 h et 96 h. Le rapport V_M/K_s montre que la perte globale d'activité est plus marquée à 1 h et 3 h, comme elle l'était au bout de 3 h à 20° C.

Les mesures effectuées au stade d'agonie sont indiquées dans le Tableau II, et les cinétiques correspondantes sont illustrées par la Figure 3.

TABLEAU III. — Paramètres cinétiques de l'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves d'abeilles du 5e stade présentant les symptômes de degrés croissants de l'état d'agonie (Agn 1 à 3).

	V_M µM/mn/µl	K_S mM	n	V_M/K_S
Témoins	7,80 ± 0,08 (N = 2)	3,77 ± 0,01 (N = 2)	0,99 ± 0,05 (N = 4)	2,07
Agn 1 (120 h)	18.8 ± 2,7 (a) (N = 2)	3,07 ± 0,46 (N = 2)	0,90 ± 0,12 (N = 3)	6,13
Agn 2 (120 h)	24,5 ± 0,6 (b) (N = 2)	3,09 ± 0,19 (N = 2)	0,97 ± 0,02 (N = 3)	7,96
Agn 3 (144 h)	20,0 ± 2,6 (a) (N = 3)	4,00 ± 0,80 (N = 3)	0,91 ± 0,02 (N = 3)	5,01

Les moyennes ± les écarts types sont données pour (N) mesures.
Différences significatives : (a) $P < 0,02$; (b) $P < 0,001$.

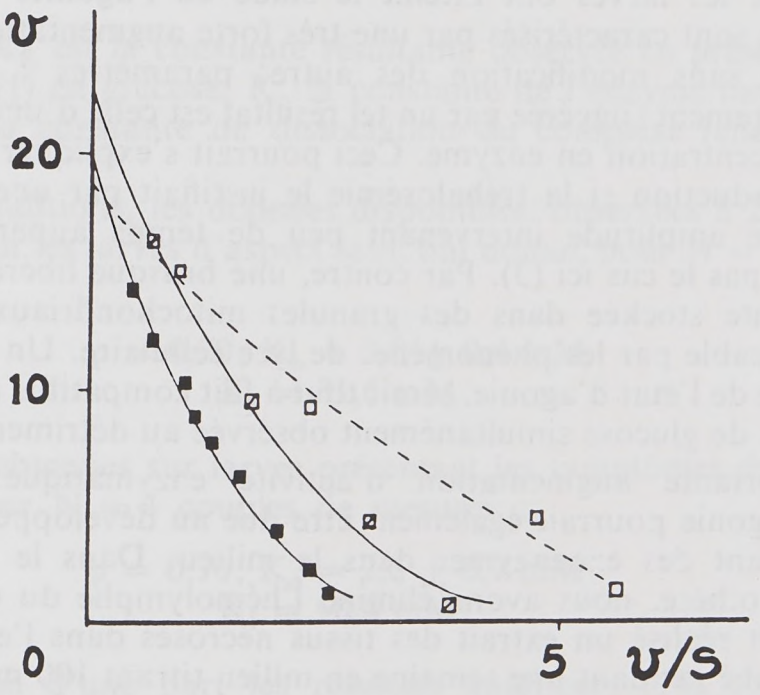


FIG. 3. — Représentations d'Augustinsson des courbes de saturation des α-glucosidases de l'hémolymphe des larves du 5e stade conservées à 7° C et représentant les symptômes d'agonie. (□) = 1er stade (120 h); ⬚ = 2e stade (120 h); (■) = 3e stade (144 h).

Une forte augmentation de l'activité apparaît due essentiellement à une élévation de la vitesse maximale sans changement des valeurs de n et de K_s.

Discussion et conclusions. — Les modifications observées au bout de 3 h à 20° C présentent les mêmes caractéristiques que celles manifestées par l'action inhibitrice du glucose à très hautes concentrations (9), ce qui n'est le cas qu'au moment de l'agonie. Les oscillations du coefficient de Hill témoignent, en l'occurrence, de modifications de la conformation du complexe enzymatique, de sorte que celles-ci pourraient être à l'origine des modifications transitoirement observées pour V_M et K_s sans que la cause puisse en être identifiée, au stade actuel de la recherche. Il est intéressant de souligner qu'une inhibition transitoire est observée également à 7° C au bout de 1 h et 3 h. Après un retour à la normale au bout de 6 h, dans les deux cas (7° C et 20° C), la vitesse maximale diminue de nouveau après 24 h et 96 h, mais le phénomène est alors accompagné d'une diminution simultanée des valeurs de K_s. Le facteur de proportionnalité est compris entre 0,39 et 0,44 pour V_M et 0,62 et 0,65 pour K_s : un tel phénomène serait compatible avec un mécanisme d'inhibition mixte dans lequel l'inhibiteur présenterait une affinité prépondérante pour le complexe enzyme-substrat. Tel n'est pas le cas du tréhalose, qui interagit compétitivement avec le para-nitro-phényl α-D glucoside en augmentant la valeur de K_s et celle de n (10).

Lorsque les larves ont atteint le stade de l'agonie, les paramètres cinétiques sont caractérisés par une très forte augmentation de la vitesse maximale sans modification des autres paramètres : l'hypothèse la plus directement suggérée par un tel résultat est celle d'une augmentation de la concentration en enzyme. Ceci pourrait s'expliquer par un phénomène d'induction si la tréhalosémie le justifiait par une augmentation de grande amplitude intervenant peu de temps auparavant (10), ce qui n'est pas le cas ici (3). Par contre, une brusque libération d'enzyme préexistante stockée dans des granules mitochondriaux (11) pourrait être explicable par les phénomènes de lyse cellulaire. Un tel mécanisme, spécifique de l'état d'agonie, serait tout à fait compatible avec la brusque libération de glucose simultanément observée au détriment du tréhalose.

L'importante augmentation d'activité enzymatique constatée au stade d'agonie pourrait également être due au développement de bactéries libérant des exoenzymes dans le milieu. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons éliminé l'hémolymphe du corps de larves mortes, et réalisé un extrait des tissus nécrosés dans l'eau. Cet extrait a été incubé pendant une semaine en milieu titrant 100 mM de tréhalose de manière à permettre la multiplication des bactéries et l'induction de tréhalase. Les activités enzymatiques ont ensuite été déterminées avec pour résultats : $V_M = 1{,}26 \pm 0{,}01$ µl/mn; $K_s = 1{,}87 \pm 0{,}91$ mM et $n = 1{,}12 \pm 0{,}26$. Ces résultats ne permettent pas d'étayer l'hypo-

thèse selon laquelle une enzyme d'origine bactérienne aurait pu contribuer significativement à l'augmentation de la vitesse maximale observée chez les larves à l'agonie.

Un examen comparatif des valeurs des paramètres cinétiques avec celles précédemment observées pour la glycémie permet de discerner une possible interdépendance de la vitesse maximale avec la tréhalosémie et la glucosémie pour l'ensemble des mesures effectuées de 24 h à 144 h, c'est-à-dire au cours de la deuxième phase des processus précédemment observés, au cours de laquelle l'hydrolyse du tréhalose en glucose paraît être stimulée (3).

Le calcul de régression linéaire a donné les résultats suivants :

$$V_M = f(Glc) : \rho = 0{,}774\ (N = 10)(P = 0{,}01)$$
$$d = 2{,}94 \pm 0{,}60$$
$$V_M = f(Tre) : \rho = -0{,}783\ (N = 10)(P = 0{,}01)$$
$$d = 3{,}12 \pm 0{,}49.$$

Ces données confirment que la libération de glucose et la disparition du tréhalose sont bien liées à l'accroissement de la vitesse maximale, donc, apparemment, de la quantité d'enzyme présente.

L'augmentation de la glucosémie est susceptible de provoquer, en retour, une modification des propriétés de l'enzyme se traduisant par une augmentation de la valeur apparente de la constante de dissociation, selon la relation suivante (13) :

$$K_R = K_o + (K_o/K_i)I$$

dans laquelle K_R est la constante résultante observée en présence de la concentration (I) en glucose, K_o la constante de l'enzyme native (pour $I = 0$) et K_i la constante de dissociation du complexe (enzyme-inhibiteur).

Dans ces conditions, les données disponibles, observées à 24 h, 96 h et 120 h, soit sur les larves d'aspect sain, ont donné, pour $N = 6$ couples de mesures :

$$\rho = 0{,}70;\ K_o = 2{,}0 \pm 0{,}4\ mM$$
$$K_i = 31{,}6\ mM$$

Les valeurs obtenues sur larves présentant les symptômes de l'agonie ont donné, pour $N = 4$ couples de mesures :

$$\rho = 0{,}76;\ K_o = 2{,}6 \pm 0{,}7\ mM$$
$$K_i = 90{,}4\ mM$$

Ceci confirme d'une part les résultats antérieurs (14) qui avaient fait apparaître, chez les larves du 5e stade *in vivo* : $K_o = 2{,}1$ mM et $K_i = 25$ mM, et montrent qu'à l'état d'agonie, la forte libération de glucose observée altère, en retour, les propriétés de l'enzyme. Chez les larves d'aspect sain, il semble être confirmé que les valeurs, mesurées pour

la constante K_S chez les témoins, reflètent également l'influence de la glucosémie naturelle.

La structure de l'enzyme paraît donc, en définitive, subir une altération spécifiquement caractérisée par un accroissement de la valeur de K_i.

Les résultats obtenus permettent donc d'apporter une explication aux variations de la glycémie des larves d'abeilles observées, en particulier, au stade de l'agonie. Les données numériques ainsi recueillies constituent, par ailleurs, une base de comparaison pouvant permettre de déceler certaines variations susceptibles de se produire sous l'action de toxiques.

Bibliographie

1. Volckaert M. & Van Laere O., *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 1984, *49*, 751-757.
2. Bounias M., Demongeot J. & Morgan M. R. J., *IRCS Med. Sci, Biochemistry*, 1984, *12*, 546-547.
3. Debevec M., Popeskovic D. & Bounias M., *Acta Veterinaria, Beograd*, 1989, sous presse.
4. Hill A. V., *J. Physiol.*, 1910, *40*, 1-4.
5. Bounias M., *C. R. Soc. Biol.*, 1978, *172*, 855-859.
6. Bounias M., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 1989, *3*, 1-9.
7. Augustinsson K. B., *Acta Physiol. Scand.*, 1948, *15* Suppl., 1-182.
8. Bounias M., Debevec M. & Popeskovic D., *C. R. Soc. Biol.*, 1988, *182*, 479-486.
9. Bounias M., *C. R. Acad. Sci.*, 1977, *285 D*, 1263-1266.
10. Bounias M. & Morgan M. R. J., *C. R. Soc. Biol.*, 1981, *175*, 46-54.
11. Bounias M. & Morgan M. R. J., *IRCS Med. Sci. Biochemistry*, 1984, *12*, 769-770.
12. Brandt N. R., Hurlburt K. L. & Huber R. E., *Can. J. Biochem.*, 1979, *57*, 1210-1215.
13. Bounias M., *C. R. Acad. Sc.*, 1977, *285 D*, 261-264.
14. Bounias M., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1980, *66B*, 335-341.

4 - Propriétés des Acétyl-cholinestérases du cerveau de l'abeille.

Thèse de Doctorat de M. L. Belzunces

L'extraction, les propriétés physico-chimiques, et la localisation de l'acétyl-cholinestérase du système nerveux central ont été traitées comme bases de futures recherches toxicologiques.

Les propriétés cinétiques spécifiques des diverses formes moléculaires devraient être étudiées comparativement, en mettant à profit la récente découverte des solutions algébriques nécessaires pour permettre le calcul (BOUNIAS, 1988, Biochem. Internat. 17, 147-154).

L'intéressé se trouvant dans la situation de n'obtenir de substantiels crédits nouveaux que sous réserve de changer de laboratoire, son départ de l'unité de Biochimie est, en principe, effectif (du moins administrativement) au 1er janvier 1990.

73

THESE

Présentée par

Luc BELZUNCES

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE II
FACULTE DES SCIENCES DE LUMINY

Spécialité

Biologie Cellulaire et Microbiologie

L'ACETYLCHOLINESTERASE D'UN INVERTEBRE : *APIS MELLIFERA.*

Propriétés physico-chimiques, polymorphisme et interactions membranaires

Soutenue le 17 juillet 1989

Devant le jury composé de :

M. M. BOUNIAS
M. J.J. LENOIR-ROUSSEAUX
M. J. MARVALDI
M. F. MIRANDA
M. R. ROSSET

74

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 11

CHAPITRE I : LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE 12

LA LIBERATION DE L'ACETYLCHOLINE 13

I - L'HYPOTHESE VESICULAIRE 13

II - L'HYPOTHESE CYTOPLASMIQUE 15

LA TRANSMISSION DE L'INFLUX NERVEUX 16

CHAPITRE II : L'ACETYLCHOLINESTERASE 18

INTRODUCTION 18

PROPRIETE CATALYTIQUES DES CHOLINESTERASES 20

I - CHOLINESTERASES DE VERTEBRES 20

II - CHOLINESTERASES D'INSECTES 21

III - MECANISME D'HYDROLYSE 23

POLYMORPHISME DES CHOLINESTERASES 26

I - FORMES ASYMETRIQUES 27

1 - Propriétés physico-chimiques 27

2 - Structure des AChE asymétriques 28

3 - Solubilisation des formes asymétriques
Interactions ioniques et membranaires 33

75

II - FORMES GLOBULAIRES CHEZ LES INVERTEBRES 36

1 - Solubilisation 37

2 - Formes hydrophiles 38

3 - Formes amphiphiles membranaires 40

3. 1. Caractère hydrophobe 40

3. 2. Ancrage membranaire des AChE amphiphiles 42

III - FORMES GLOBULAIRES CHEZ LES INVERTEBRES 46

1 - Polymorphisme des AChE d'Invertébrés 46

2 - Mode d'ancrage des formes membranaires 49

GENETIQUE MOLECULAIRE DES CHOLINESTERASES 50

I - CARACTERISATION DES ARN MESSAGERS ET DES ADN COMPLEMENTAIRES 50

II - SEQUENCES DES CHOLINESTERASES 51

ETUDES IMMUNOLOGIQUES DES CHOLINESTERASES 53

I - SPECIFICITES IMMUNOLOGIQUES DES AChE ET DES BuChE 53

II - SPECIFICITE D'ESPECE 54

III - SPECIFICITE MOLECULAIRE ET TISSULAIRE 55

LOCALISATION CELLULAIRE ET TISSULAIRE DES CHOLINESTERASES 58

I - CHOLINESTERASES DE VERTEBRES 58

1 - Répartition tissulaire 58

2 - Répartition subcellulaire 61

2. 1. Distribution des activités endo et ecto-cellulaires 61

2. 2. Répartition des formes moléculaires dans les cellules musculaires 62

2. 3. Répartition des formes moléculaires dans les cellules nerveuses 63

II - ACETYLCHOLINESTERASES D'INVERTEBRES 64

1 - Localisation neurale de l'acétylcholinestérase 64

1. 1. Localisation cellulaire et tissulaire 64

1. 2 Localisation subcellulaire 65

2 - Localisation aneurale de l'acétylcholinestérase 66

76

BIOSYNTHESE DES ACETYLCHOLINESTERASES 67

I - RENOUVELLEMENT DES FORMES MOLECULAIRES 67

II - ASSEMBLAGE, TRANSPORT INTRACELLULAIRE ET SECRETION DES AChE 69

FONCTIONS ASSOCIEES AUX CHOLINESTERASES 70

I - ACTIVITE PEPTIDASIQUE DES CHOLINESTERASES 71

II - ACTIVITE ARYL ACYLAMIDASE DES CHOLINESTERASES 73

III - FONCTIONS CHOLINERGIQUES EN ABSENCE D'INNERVATION 74

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS 75

ARTICLE I 76

INTRODUCTION A L'ARTICLE I 77

DISCUSSION DE L'ARTICLE I 88

ARTICLE II 93

INTRODUCTION A L'ARTICLE II 94

DISCUSSION DE L'ARTICLE II 105

ARTICLE III 122

INTRODUCTION A L'ARTICLE III 123

DISCUSSION DE L'ARTICLE III 155

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 161

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 164

77

ARTICLES PRESENTES A L'APPUI DE CETTE THESE

Article I :

L.P. BELZUNCES , J.J. Lenoir-Rousseaux , M. Bounias.

Properties of acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head.
Insect Biochem. (1988) **18**, 811-819.

Article II :

L.P. BELZUNCES, J.P. TOUTANT, M. BOUNIAS.

Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation.

Biochem. J. (1988) **255**, 463-470

Article III :

L.P. BELZUNCES, M. THEVENIAU, P. MASSON, M. BOUNIAS.

Membrane acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Glycolipid anchor and membrane interactions : their possible roles on enzyme activity.

Soumis à Biochem. J.

5- Associativité moléculaire dirigeé par le substrat.

Le manuscrit présenté dans le C.R. 17, p. 89-107, a été soumis à l'appréciation du Professeur Tamas Keleti, de l'Institut d'Enzymologie de l'Acad. Sc. de Budapest,* qui en a recommandé la publication. Soumis, régulièrement, à deux examinateurs, il a été accepté, et constitue une avancée dans la compréhension de certains phénomènes de coopérativité apparente modulable.

Le modèle permet de prédire une diminution du coefficient de Hill, en cas de dissociation des complexes, vis à vis d'un substrat artificiel: c'est ce qu'a, effectivement démontré l'étude suivante, réaliseé dans le cadre de la thèse préparée, au laboratoire, par Mme Debevec (Collaboration Franco-Yougoslave).

* Le Prof. Tamas Keleti est, malheureusement, décédé récemment. Reconnu comme une autorité mondiale en enzymologie théorique, il était l'auteur de l'un des meilleurs ouvrage sur la cinétique enzymatique.

La suite (et l'achèvement) de ce programme a pour objet l'élaboration de l'équation représentative des variations du coefficient de Hill des α glucosidases de l'hémolymphe d'abeilles en fonction des concentrations du glucose, et la vérification expérimentale de la théorie.

DEPENDENCE OF THE ACTIVE SITE OF LARVAL HONEYBEES HAEMOLYMPH α- GLUCOSIDASE ON THE AGGREGATION OF ENZYME SUBUNITS

Mirjana Debevec†, M.Bouniass†† and D.Popeskovic†

†Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biology, P.O.Box 370,11000 Beograd,Yugoslavia

*††Laboratory of Biochemistry, University and INRA-Avignon,B.P. 91,F-84140 Montfavet,France

ABSTRACT

In vivo treatment of the α-glucosidase of larval honeybees haemolymph by dithiothreitol, dissociated the fractions of higher degree of association into smaller forms. In the same tame, although the maximum velocity of the enzyme remained unchanged, the dissociation constant increased and the apparent Hill coefficient decreased.

A model is proposed,based on the previously suggested hypothesis of substrate-induced association of enzyme subunits resulting in the constitution of low specificity active sites at the function of two protomers. The data are in full agreement with the stoichiometric significance that the apparent Hill coefficient is predicted to exibit in such conditions. The major molecular forms involved in the model have been experimentally characterized by gel filtration.

80

It has been pointed out for a long time, that isoenzymes patterns could be the reflect of polymeric structures (FAJSZI & KELETI, 1972) and that such dissociable tetramers could exibit characteristic allosteric interactions (BATKE,1972).Then, the possibility that the conformation of enzyme association into complexes with apparent cooperativity can be induced by substrates, has been pointed out by KURGANOV (1983). In the same time, a similar hypothesis led Bounias (1983) to show that in the α-glucosidase complex of honeybees haemolymph, the apparent Hill coefficient of the whole complex was nearly identical to the ratio of the partial order of substrate to the partial order of enzyme. Experimental results on the rapid adaptation of this enzyme activity to the introduction of exogenous substrates, prior to strictly inductive (DNA dependent) mechanismes (Bounias & Morgan,1984a), were completed by the fact that the specific substrate, i.e. trehalose gave a Hill coefficient significantly higher than one ($n \simeq 1.4$) whereas a non specific substrate, such as sucrose, gave a Hill coefficient $n \simeq 0.65$. This was followed by the observation that incubation of a crude enzyme extract with high concentrations of trehalose or sucrose, for a short time,brought significant changes in the subsequent distribution of electroforetic molecular forms of the enzyme (Bounias,1986).

The whole set of data suggested the hypothesis that the aggregation of honeybees haemolymph α-glucosidases complexes could be directed by the structure of the substrate present in the medium, and that independently of full specific sites present on the smallest active monomers, subsites could be asymmetrically present on each side of the monomers, one containing only a binding area and other both a binding area and a catalytic group. The gathering

of these two subunits by association of two protomers would give a non specific active site (Bounias,1984, 1986, 1988.). Previous studies on haemolymph carbohydrate concentrations and α-glucosidase activities of 5th instar larvae of honeybees,as a basis for toxicological researches (Debevec et al.1989 a,b) have shown that the pattern of molecular forms of pNPα-D glucosidases was rather similar to the one observed in emerging adults (Bounias and Morgan,1984 b) so that the general mechanism might be of the same type. According to the abovely described mechanism, it could be predicted that the rapid dissociation of the enzyme complex of higher degrees of association into smaller forms will decrease the actual number of active sites of the non specific type, and therefore decrease the apparent Hill coefficient of the new complex for pNP α-D glucoside, since the number of protomers present in the medium remain the same. Preliminary work have shown that di-thiothreitol (DTT) was able to acheive such a disaggregation and the aim of the present report is to examine the variations of the molecular pattern and of the apparent kinetic properties and apparent cooperativity brought to the enzyme by DTT treatment in haemolymph extracts of 5 th instar honeybees larvae.

MATERIAL AND METHODS

Worker honeybees larvae (Apis mellifera,Mellifera L.)were gently removed from their alveoli in the brood combs, at the 5 th instar, i.e. after they have ceased feeding, just before the operculation which precedes the beginning of nymphosis. Larvae were then placed at 7 °C in glass dishes for 24 h. The haemolymph was punctured using Hamilton microsyringes . The various active molecular forms

82

were separated by polyacrilamide gel electroforesis (PAGE) in not denaturating conditions, in pH 8.5 Tris-Gly buffer: 50 min at 80 V followed by 35 min at 160 V. Gel tubes Ø o.5 cm x 6 cm length were used , and gels were prepared with 7.5% acrylamide. Standard proteins were HMW kit from „Pharmacia". After the electrophoresis, gels were cut in 2 mm slices and each slice was stirred in 200 µl buffer (Tris HCl pH 6.8,50 mM) for enzyme extraction. The enzyme activities were then determined by photometric recording at 410 nm of the absorption of pNP released after 1 h incubation in 10 mM pNP ∝D glucoside. The reaction was stopped using 5N sodium hydroxide.

Kinetic studies were performed by continnous recording of the absorption of pNP in an incubation medium containing 50 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8 (optimal for the enzyme activity), 5 µl of haemolymph for 200 µl of total volume, substrate and DTT in appropriate concentrations.

DTT was added in the medium immediately before recording. The non-Michaelian kinetic parameters were determined using previously described algebraic methods (Bounias, 1979, 1989). Gel filtration were performed using a 50 ml column of Sephadex G-200 coupled with a ISCO fraction collector. Enzyme activities were recorded as for kinetic studies, using 20 µl eluate in 100 µl of reaction volume, with a final substrate concentration of 16 mM. The calibration curve used for molecular weight (M.W.) estimations was prepared using Pharmacia "H.M.W." and "L.M.W." protein kits as standards.

Regresion slopes were calculated using the least square method . Comparisons of means were acheived using the Student 's "t" test. The probabilities of significances (i.e. the risk level) associated to the "t" test and "chi square" test are noted P (t).

RESULTS

Following 5 min. incubation at room temperature in various DTT concentrations gave the results illustrated by fig. 1. The major form of higher degree of association is rapidly dissociated into smaller forms. The calculated relative activities of the various molecular forms are indicated in Table I.

DTT apparently inhibits the enzyme at rather high concentrations. The variations of initial velocities versus DTT concentrations with a constant 5mM substrate concentration are illustrated by fig. 2. The Hill coefficient of the fixation of DTT on the enzyme and the I_{50} value (concentration giving half the control velocity, i.e. $v_i = v_0/2$) can be deducted from the logarithmic form of the CHOU plot (CHOU, 1976):

$$(v_0/v_i - 1) = (I/I_{50})^{n_i}$$ that is:

$$\text{Ln} (v_0/v_i - 1) = n_i \text{ Ln } I - n_i \text{ Ln } I_{50}$$

Then: $n_i = 1.01$ and $I_{50} \simeq 912$mM

The characteristic kinetic parameters of the enzyme have been studied in control samples and in the presence of 600 mM DTT. The results are illustrated by fig.3 and the numerical values of the parameters are given in table II. Maximum velocities remain unchanged by the treatment, whereas the dissociation constants are increased and the Hill coefficients decreased by DTT with significance. The obtained values allow the inhibition constant Ki for

84

DTT to be estimated: Ki ≃ 247 mM. This confirms the weakness of the inhibitory action of this reagent, by contrast with the reported action of mercaptoethanol which depresses by 18% the trehalase activity of whole body extracts at 1 mM. (Lefebvre and Huber, 1970). Fig. 4 illustrates the profiles obtained after gel filtration of larval honeybees haemolynph on Sephadex G 200. A loo µl sample gives one major fraction (I) exibiting an apparent MW ≃ loo,ooo (fig. 4 A) The peak containing tubes (29-37) were kept for 48 hr at 4°C and then rechomatographed (fig.4 B). The major form (I) still appeared, accompanied by 3 minor ones with higher MW (forms II and III, about 400,000 and 2oo,ooo respectively) and lower MW (form IV, about 50,ooo).

DISCUSSION

The kinetic data show that DTT acts as a mild inhibitor, one molecule of which reacts with one molecule of enzyme at the level of active sites, i.e. in a purely competitive way. This interaction occurs in the same time as the enzyme complexes are progressively dissociated. Such results are consistent with the hypothesis of the formation of enzyme complexes by substrate-directed aggregation of protomers (Bounias, 1986 and 1989) and apparently mean that DTT competitively supresses the pNP α D Glucoside sites by dissociating the two subsites likely existing, one on each of the aggregated protomers.

Previous research (Bounias,1983) had shown that treatment for a long time by DTT is able to release smaller units of MW about 5o.ooo at the expense of all others. These molecules, likely, represent the smallest enzyme units, relatively more active on the

specific substrate trehalose. They could be rather strongly bound to one another as forms of MW~loo.ooo which represent the protomers that are then reversibily aggregated under the action of substrates. These protomers appear, after gel filtration as the major form (fraction III) present in our extracts and show very similar to the form described by Lefebvre and Huber (1970) in whole bodies extracts. Minor amounts of dimers (fraction II: MW~ 200.000) and tetramers (fraction I MW~400.000) are detected, as well as the smaller form (fraction IV : MW~50.000) which thus exibit some activity on the artificial substrate used. It is noteworthy that fraction I, II and IV can be spontaneously produced from the major form III, independently from the presence of substrates as aggregation factors, since no substrate molecules were present in the fractions rechomatographed after a first elutions. This distribution is likely due to the fact that entering the gel eliminates the small carbohydrate molecules which maintain the aggregates structures, and to the fact that also glucose terminal radicals of Sephadex gels compete with these molecules. However, a number of higher aggregates remain in the medium, which means that they should have a significant dissociation consta nt.

This set of results now allows a plausible model to be proposed. As an oversimplified hypothesis, fig. 5 indicates the putative molecular forms that could exist and their likely dissociation under the short term action of DTT (i.e. without breacking the strongest bonds). Consider an initial ratio of forms 1 and 3, the latter being possibly composed of two subfractions of very similar properties, i.e. for instance differing by the mode of chaining of the asymmerric subunits.

One hypothesis would clearly account for all these considerations: the major form, i.e. the more stable one, could be composed of 2

subunits differing by the fact that one would exhibit a modification of the side catalytic half-site: in this case, the catalytic power would be highly decreased, and repleaced by a corresponding higher affinity for the other half-site. One single modification, as for instance the replacement of a histidine residue by another amino-acid, resulting from a point mutation would be sufficient for acheiving such a result. This is illustrated on fig. 5 in a shematic way.

Then, according to the model, the distribution of dissociated forms would appear as indicated in table III. The patern of predicted relative activities of the final 3 forms is very close to the experimentally observed one (table I), and the "chi square" test gives a risk P>> 0.5. Then assuming that a small number of pNP α D Glucoside can bind the trehalose specific site, for instance one to each ringed tetramer (from A) due to the relevant mechanical constraints. The predicted apparent Hill coefficient would be slightly higher than one, in controls significantly lower than one after DTT treatment: this is what was actually observed in the experiments. The close agreement between the experiments and the predicted consequences resulting from the proposed model, suggests that fraction 1-2-3-4 (in table I) could be respectively identified to forms A-B-C-D (in table III), with a likely analogy between forms A and I, D and II.

These results bring a contribution to our understanding of the very particular mechanism of action of the honeybees haemolymph α-glucosidases and confirm, through a new approach, the hypothesis previously suggested on the interaction of substrate with enzyme aggregation and apparent cooperativity. They additionally allow to interpretate the facts that a single major form is observed in the absence of substrate, and that an apparent substrate inhibition

was mentioned by Lefebvre and Huber (1970) on the basis of the curvature of the Augustinsson -Woolf-Hofstee plot: this curvature is first consistent with the apparent positive cooperativity both predicted by the model and experimentally verified. Then a high trehalose concentration might elicit an increase of the dissociation of the α glucosidase complexes (Kurganov, 1984) and thus result in an apparent decrease of effective sites, i.e. in effect, an apparent decrease of crude activity. To our knowledge, this work brings about one of the first experimental proofs to the theories of Fajszi and Kelet. (1972) and Kurganov (1983-1984).

REFERENCES

BATKE, J., (1972). J. Theor. Biol. 34, 313-324.

BOUNIAS, M & MORGAN, M.R.J., 1984 a. Comp. Biochem. Physiol., 79 B, 75-80.

BOUNIAS, M & MORGAN, M.R.J., 1984 b. Internat. J. Biochem., 16, 939-941.

BOUNIAS, M., 1979. Comp. Biochem. Physiol., 63 B, 407-417.

BOUNIAS, M., 1984. .Rev,Fr.Apic. 438, 84-89.

BOUNIAS, M., 1986. Lecture for the clebration of the 50th Anniversary of the Faculty of Veterinary Medicine, Beograd, Nov. 13.

BOUNIAS, M., 1988. C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 17,

88

BOUNIAS, M., 1989. Acta Biochim. et Biophys. Hungarica, (In press).

BOUNIAS, M., 1989. Fundam. Clin. Pharmacol., 3, 1-9.

BOUNIAS, M.,1983. . C.R.Acad.Sc. (Paris), 297, III, 583-588.

DEBEVEC, M., POPESKOVIĆ, D., & BOUNIAS, M.,1989 b. C. R. Soc. Biol.In Press

DEBEVEC, M., POPESKOVIĆ,D. & BOUNIAS, M. 1989a. Acta Veterinaria, Vol.39, 4. In Press

FAJSZI, C.S. & KELETI, T., 1972. Biopolymers, 11, 119-126.

KURGANOV, B. I., 1983. J.Theor. Biol., 103,227-245.

KURGANOV, B.I., 1984. J. Theor. Biol., 109, 59-70.

LEFEBVRE, Y.A. & HUBER,R.E., 1970. Arch. Biochem. Biophys., 14o, 514-518.

TABLES

Table I. Relative activities ratios (%) of the various electrophoretic molecular forms of α glucosidases in control and DTT-treated haemolymph of 5th instar larvae of honeybees. For duplicate determinations, the variation coefficients are: cv = 0.15

	DTT (mM)		
Form No. 0(contr.)	60	150	600
1	74.7	49.5	47.8	19.7
2	0.0	18.9	27.4	37.9
3	25.3	15.3	0.0	0.0
4	0.0	16.2	24.7	42.3

Table II Kinetic parameters of pNP α-D glucosidase activities in the haemolymph of 5th instar larvae of honeybees. Comparisions are made between values obtained in controls and DTT-treated samples. Means ± SD are given from (N) determinations.

	controls	600 mM DTT	P(t)
maximum velocity µM/mn/µl	3.47 ± 0.15 (N = 3)	3.38 ±0.73 (N = 3)	0.80
dissocation constant mM	2.34 ± 0.13 (N = 3)	8.02 ± 0.53 (N = 4)	<0.001
Hill coefficient	1.10 ± 0.009 (N = 3)	0.70 ± 0.05 (N = 3)	<0.01

90

Table III Hypothetic distribution of molecular forms (as on fig.4.) of haemolymph α glucosidases of 5th instar honeybees larvae, and predicted values for their % activity and final apparent Hill coefficients, n_o and n_i.

	controls	600 mM DTT
molecular forms	N_r.(E/S) %	N_r.(E/S) %
A	6 (24/30) 77%	1 (4/5) 22.7%
B	3 (9/9) 23%	0
C	0	4 (12/8) 36.4%
D	0	9 (18/9) 40.9%
E	1 (1/0) 0%	0
	predicted n_o =1.14	predicted n_i = 0.6

Nr = number of molecules *E = nr.of enzyme subunits*
S = number of substrate sites
% = contribution of each form to the total activity

CAPTIONS OF FIGURES

fig.1.

A.Distribution of α-Glucosidase activities in not deneturing PAGE.Each fraction represents a 2mm gel length. (—o—) controls; (--•--) 60mM DTT; (··▽··) 150mM DTT; (—□—) 600mM DTT after 15mn incubation. B. Standard proteins in the same conditions: a-b ferrilin (MW = 440.000) and subunit; c = thyroglobulin subunit (MW= 334.000); d = catalase (MW = 232.000); e = aldolase (MW = 158.000); f = Bovine serum albumin (MW = 67.000); Means of duplicate determinations. FN = fraction numbers.

fig. 2.

Inhibition of haemolymph α glucosidase activities by increasing DTT concentrations. Direct plot (—•—) and logaritmic representation (--o--) (units as on fig 2).

Fig. 3.

Augustinsson plot of haemolymph α glucosidase activities of 5th instar larvae: controls (--o--) and in presence of 600 mM DTT (—•—). Substrates (S) are expresed in mM and velocities (v) in μM/mn/μl. Values are means of triplicate determinations.

92

Fig. 4.

Gel filtration of haemolymph α glucosidases of honeybees 5th instar larvae on Sephadex G 200. The molecular weight of fractions I-II-III-IV left was estimated using the calibration curve obtained with standard proteins (right). Enzymic activities of fractions are indicated as the absorbance of released pNitro Phenol at 410 nm.

Fig. 5.

Schematic representation of the observed changes in enzyme structure and apparent cooperativity one arrow (⟶) represent one protomer as detailed in the lower right side. The points of arrows (⟶) illustrate catalytic groups. Non specific sites are created and the junction of 2 units except on the major protomer made from two distinct monomers, more strongly linked at the site which has lost its catalytic ability: ① catalytic, binding half site. ② specific active site. ③ non catalytic junction with high stability. ④ non catalytic, binding half site.

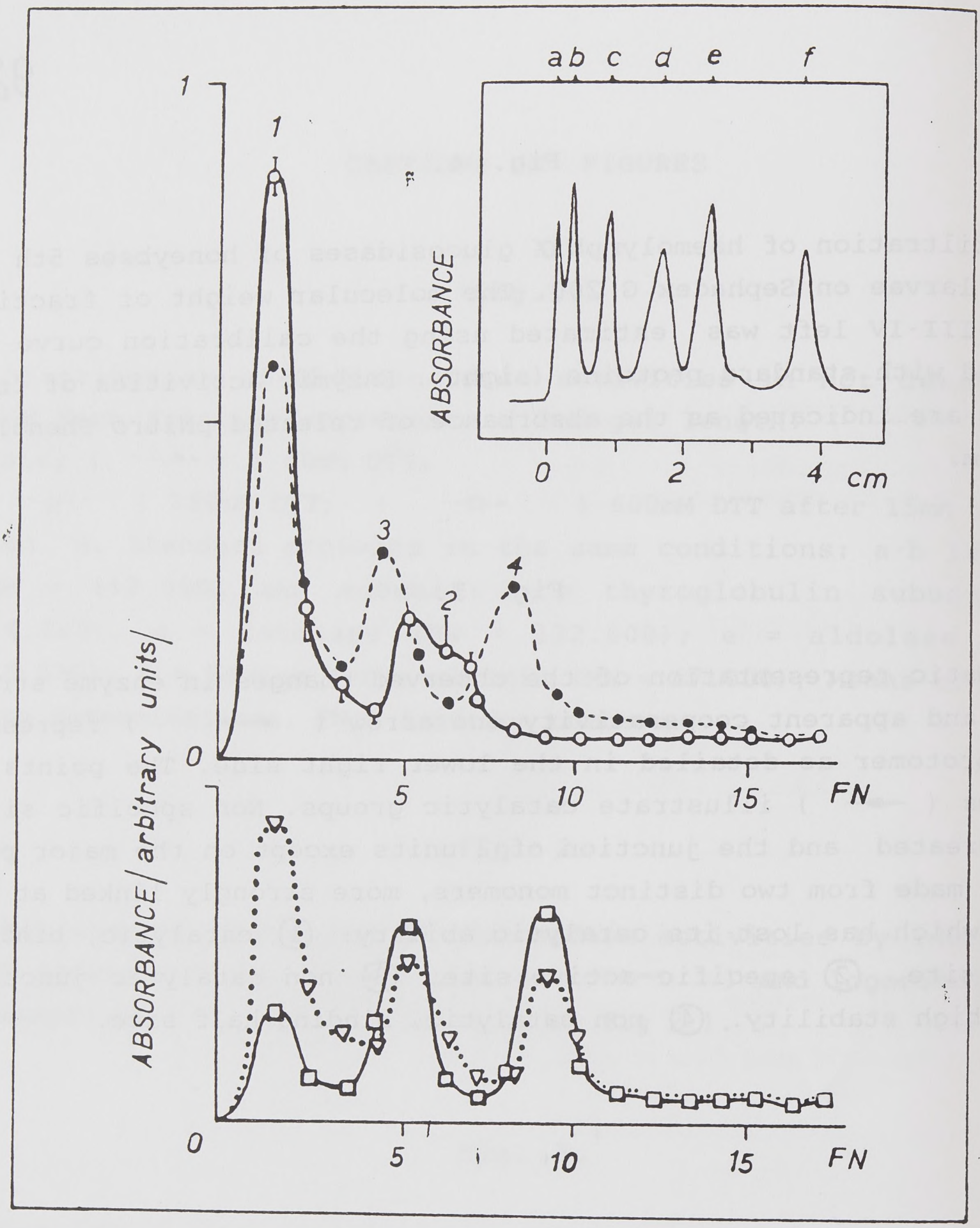

a b c d e f
ABSORBANCE
0
2
4 cm
1
1
3
2
4
0
5
10
15
FN
ABSORBANCE / arbitrary units /
0
5
10
15
FN

FIG.1

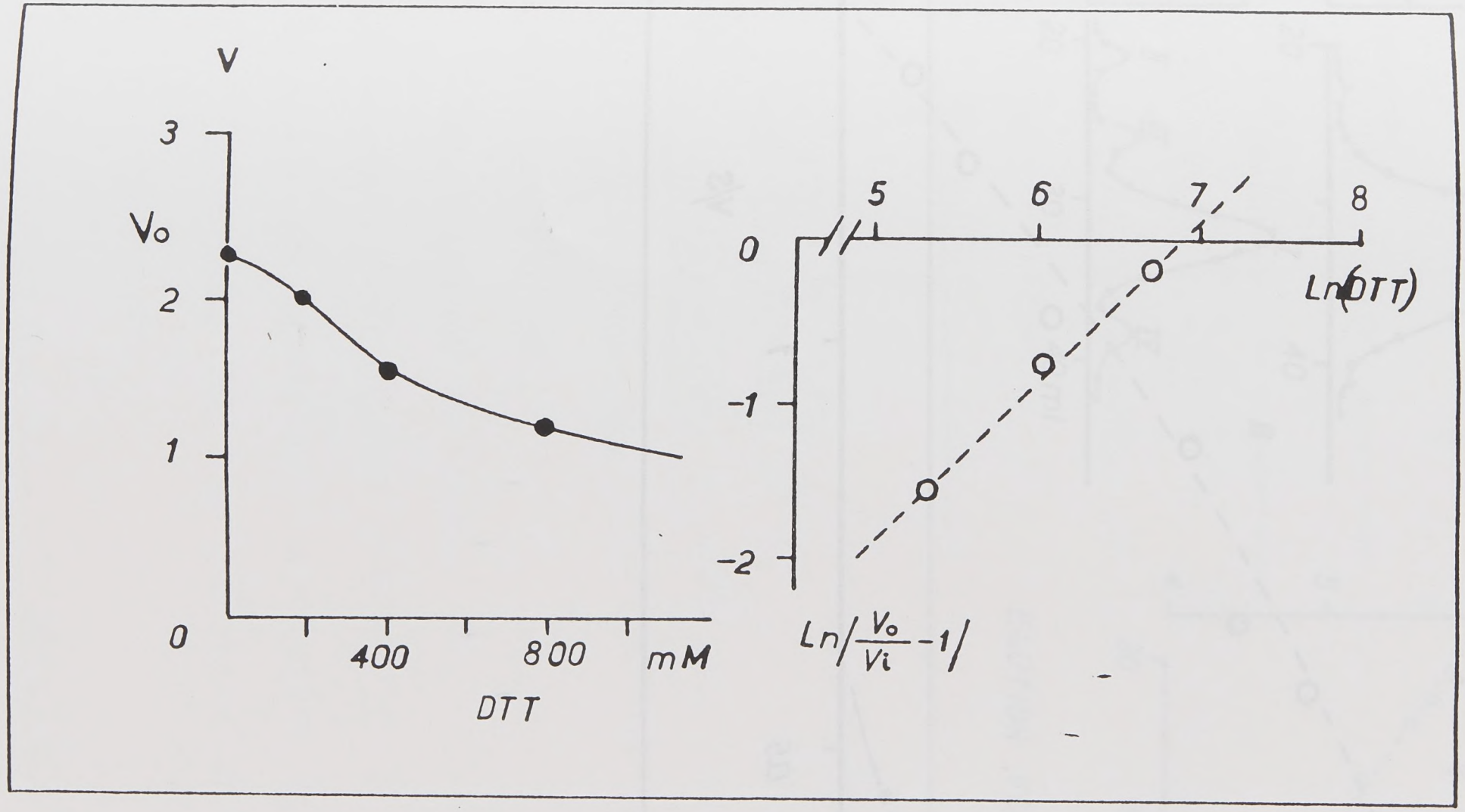


FIG.2

FIG. 2

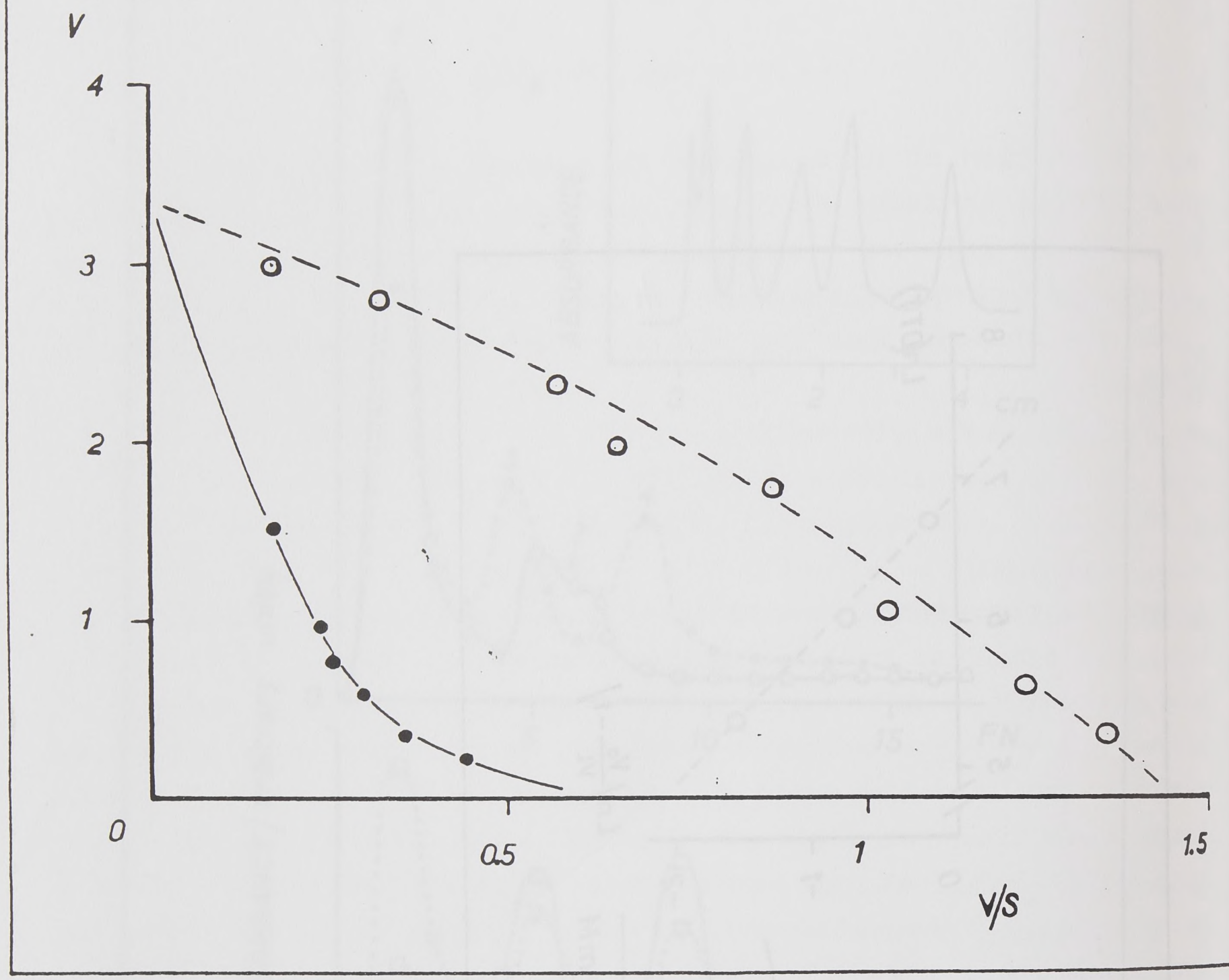
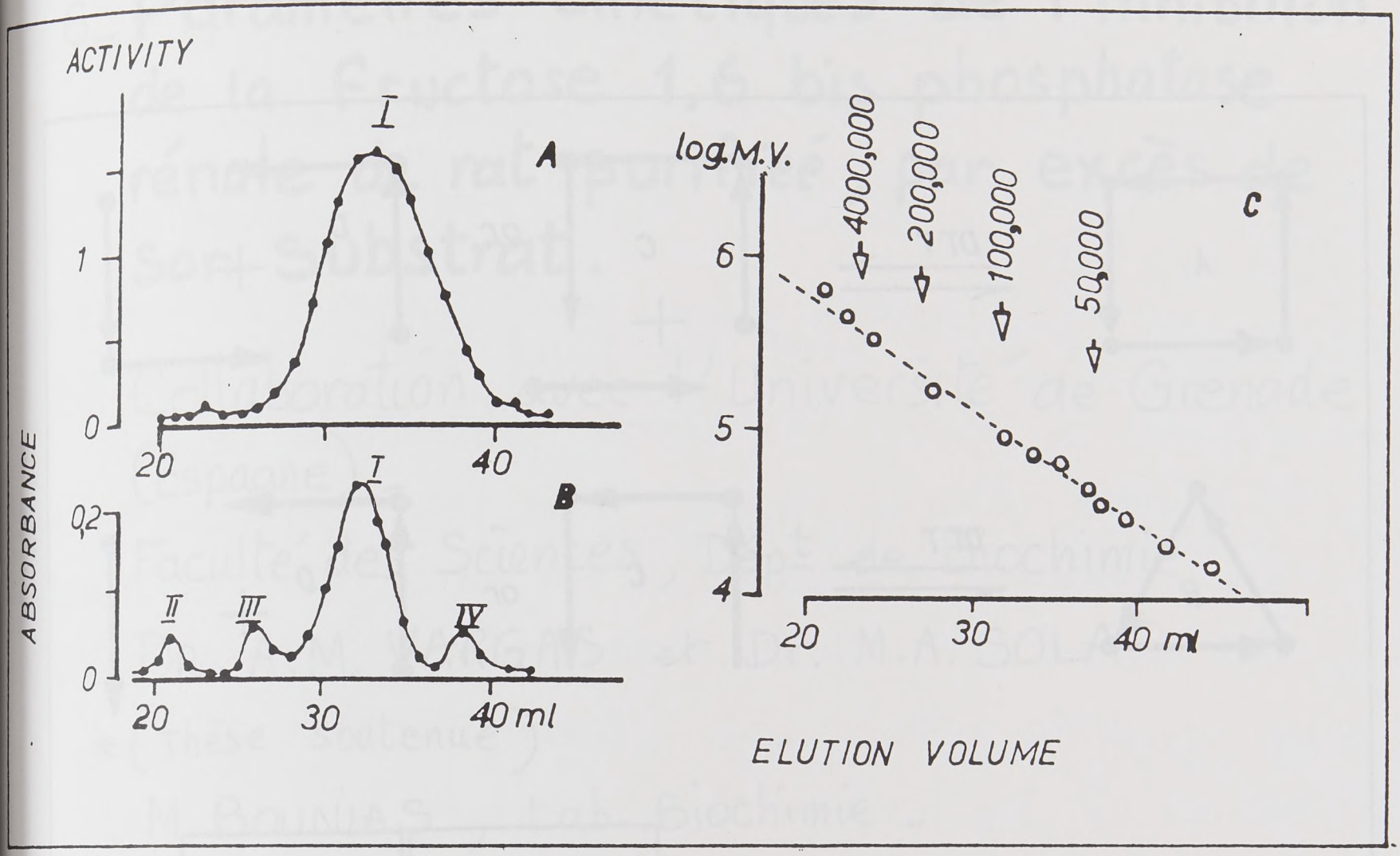


FIG. 3

FIG. 4


ACTIVITY
A
I
1
0
20
40
B
I
II
III
IV
0,2
0
20
30
40 ml
ABSORBANCE
log.M.V.
C
4000,000
200,000
100,000
50,000
6
5
4
20
30
40 ml
ELUTION VOLUME

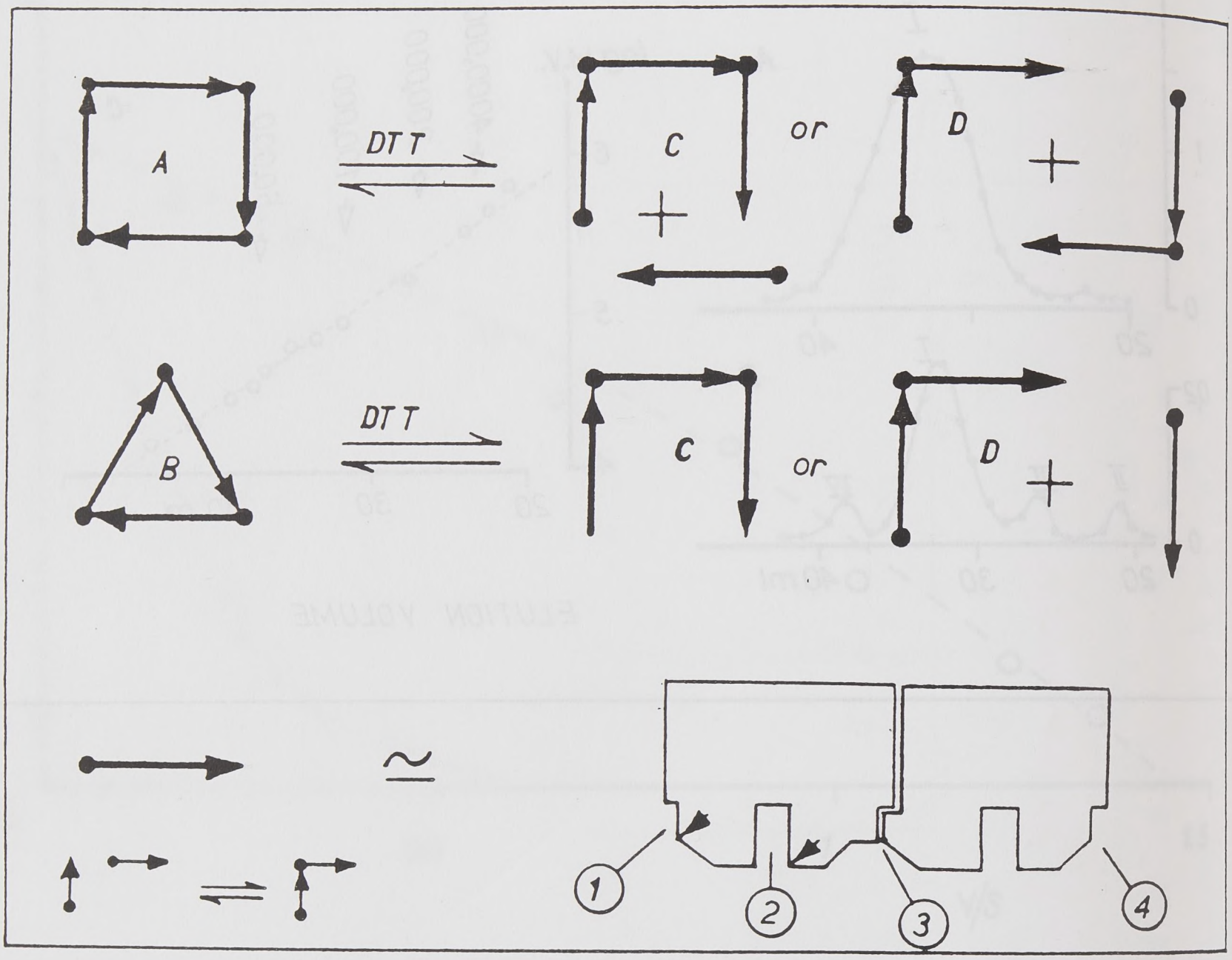


FIG. 5

6- Paramètres cinétiques de l'inhibition de la Fructose 1,6 bis phosphatase rénale de rat purifieé, par excès de son Substrat.

Collaboration avec l'Université de Grenade (Espagne) -
Faculté des Sciences, Dépt de Biochimie
DR. A.M. VARGAS et Dr. M.A. SOLA*
*(thèse soutenue)
M. BOUNIAS, Lab. Biochimie -

La Fru 1,6 bis phtase est une enzyme qui, dans le rein du mammifère, cumule deux difficultés : elle est inhibeé par excès de substrat, et sa cinétique n'est pas michaëlienne.

Les travaux antérieurs du Laboratoire de biochimie (M. Bounias, 1988, Biochem. Internat. 17, 147-154) sont, jusqu'ici, les seuls qui permettent de résoudre ce problème, ce qui a été à l'origine d'une collaboration maintenant destineé à se poursuivre.

Les pages qui suivent présentent un résumé des résultats de la contribution apportee par le partenaire d'Avignon -

The kinetic curve for fructose 1,6-BPase purified from rat kidney cortex is shown in figure 1. A marked substrate inhibition is observed when the substrate concentration is raised beyond 20 µM.

Determination of Sm - From the direct plot, the substrate concentration Sm giving the higher observable velocity v_m is between 10 and 14 µM, more likely between 11.0 and 12.5 µM. Taking in consideration the fact that at velocity V_1 for $S_1 = 1$ unit, there corresponds a second substrate value which is actually S_m^2 (BOUNIAS, 1986), several estimations of Sm infer from changes in units of substrate concentrations, e.g. : 1 unit = 5 µM ; 7.5 µM ; 6.25 µM. The average value was $\overline{Sm} = 12.40 \pm 0.60$ µM from N = 3 independent determinations -

Determination of the Hill coefficient - Using various pairs of data (V_i, S_i) (V_j, S_j) so that $S_i \cdot S_j = 1$, plotting V_j^{-1} versus V_i^{-1} $(S_i > 1)$ or V_i^{-1} versus V_j^{-1} $(S_i < 1)$ gives a regression equation whose slope b is independent of S : $b = K_S \cdot K_{ses}$ (BOUNIAS, 1989). In this expression, K_S is the enzyme-substrate dissociation constant of active complex, and K_{ses} the dissociation constant of the inhibitory binding of substrate to the active enzyme-substrate complex. Then, since $K_S \cdot K_{ses} = S_m^{2n}$, where n = Hill coefficient of the binding of substrate to the catalytic site, it comes

$$n = \ln b / 2 \ln Sm$$

This particular case can be generalized to $S_i \cdot S_j$ = constant, which actually corresponds to a simple appropriate change in substrate units. Following N = 3 independent determinations, the average value was the following: $n = 2.0 \pm 0.4$, i.e. a coefficient significantly higher than unity, suggesting an apparently positive cooperativity.

Determination of maximum velocity. Considering the general equation:

$$v_i = V_M \cdot S_i^n \Big/ \left[k_s + (1 + k_s/K_{se})\, S_i^m + S_i^{2n}/K_{ses} \right] \quad [1]$$

where K_{se} is the dissociation constant of the hypothetic inhibitory binding of substrate directly on the enzyme, then, the ratio $V_M/(1 + k_s/K_{se})$ is obtained from the horizontal intercept of a straight line defined by the following two pairs of coordinates: $x_1 = v_1$; $x_2 = v_m$; $y_1 = v_1 (S_m^n + S_m^{-n})$; $y_2 = 2 v_m$. (BOUNIAS, 1986). Using N = 3 values of n representative of mean ± SD, the obtained value was:

$$V_M/(1 + k_s/K_{se}) = 10.1 \pm 0.5 \quad \mu M/mn/mg \text{ protein}.$$

Then, plotting the logarithmic form of equation [1] using the exact value of V_M should give a symmetric curve whose tangents at $\ln S \to \pm \infty$ are $(+n)$ and $(-n)$ respectively:

$$\ln\left[v/(V_M - v)\right] = n.\ln S - \ln K_s\left[1 + S^n/K_{se} + S^{2n}/S_m^{2n}\right] \quad [2]$$

with the following asymptotes :

$$\text{for } S \to 0 : \ln\left[v/(V_M - v)\right] \to n.\ln S - \ln K_s \quad [3]$$

$$\text{for } S \to \infty : \ln\left[v/(V_M - v)\right] \to -n.\ln S + \ln K_{ses} \quad [4]$$

Using several plots for which $\overline{V_M} = 9.9 \pm 0.2$ µM/mn/mg, the maximum average value obtained for the Hill coefficient was $n = 1.60 \pm 0.40$ ($N=4$) which is statistically consistent with the previously determined value, and means that $V_M/(1 + K_s/K_{se})$ cannot exceed 10.1 µM/mn/mg, i.e. $(1 + K_s/K_{se}) = 1$. Hence, $K_s/K_{se} = 0$, then $K_{se} =$ infinity, which indicates without any ambiguity that the substrate cannot directly bind to the free enzyme as an inhibitor.

Determination of dissociation constants. From three independent plots of $\ln[v/(V_M - v)]$ versus $\ln S$, the vertical intercepts of the maximum slopes gave the following results :

$$K_s = 4.7 \pm 1.2 \text{ µM}$$

$$K_{ses} = 594 \pm 186 \text{ µM}$$

Fig. 2 illustrates a representative case of the Hill plot, given according to equation [2].

These data first confirm that the active binding of Fru 1,6 bis phosphate to the catalytic site of FBPase occurs with an apparent positive cooperativity involving 2 substrate molecules for each enzymic functional unit.

Then, a low but significant binding of substrate to the active enzyme-substrate complex is responsible to the inhibition by substrate excess. This binding occurs with a 126 times lower affinity than the previous one, but is sufficient to produce the observed effect.

By contrast, it clearly appears that fructose-1,6 bis phosphate cannot directly bind as an inhibitor to the free enzyme. This is consistent with the non existence of an inhibitory allosteric site for hexoses bis phosphate on the free enzyme molecule.

the inhibitory site of substrate only appears after its own binding to the catalytic site, and the physiological significance of this role of hexose bis phosphate remains to be elucidated.

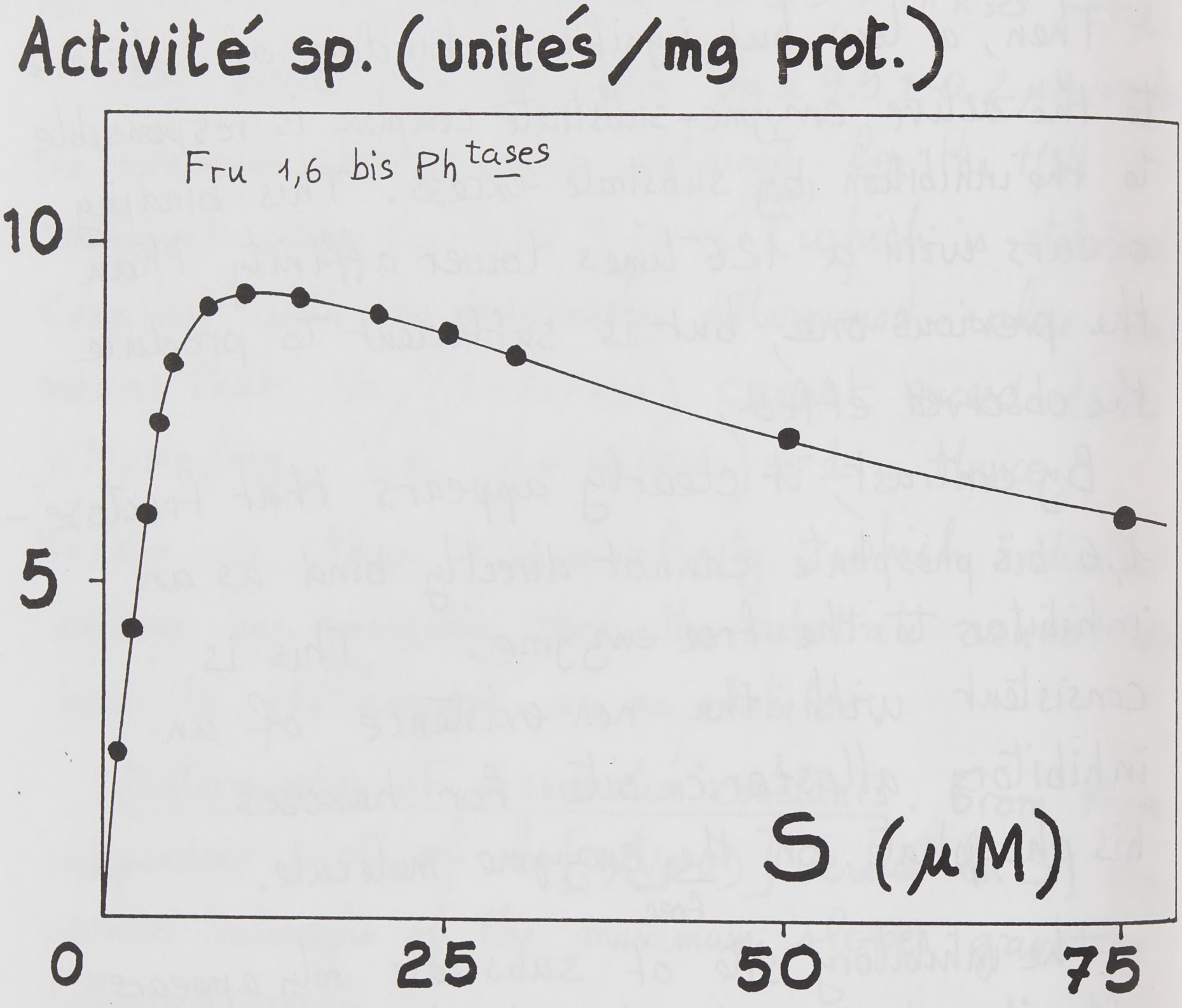


Fig. 1 - Variations de la vitesse de réaction en fonction des concentrations en substrat (dont les unités subissent divers décalages, pour les besoins du calcul).

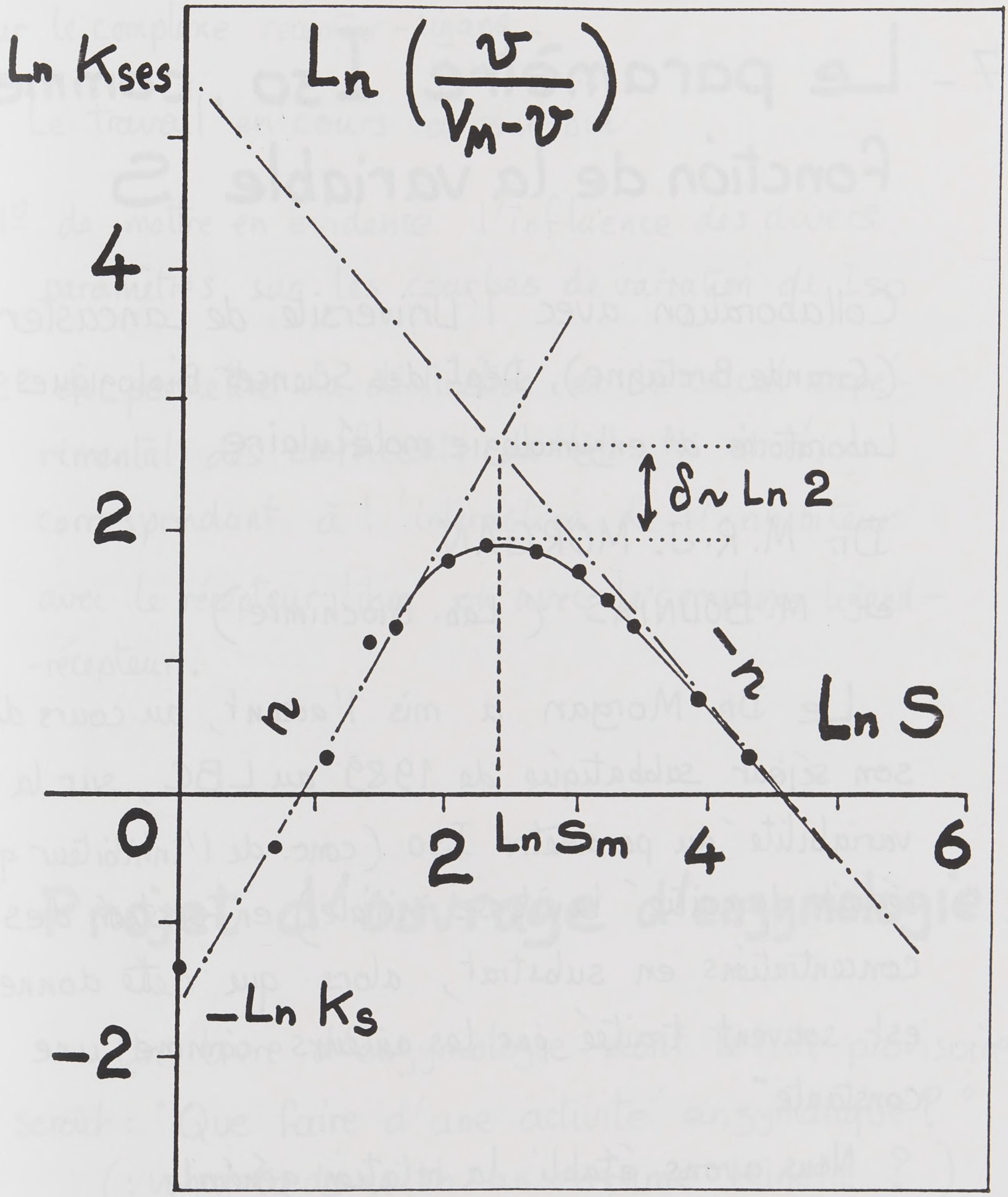


Fig. 2. Transformation en coordonnées de Hill (d'après BOUNIAS, 1986 : C. R. Acad. Sc., 303 (2) III, 495-500) des variations de la vitesse de réaction en fonction des concentrations en substrat.

7 - Le paramètre I_{50}, comme fonction de la variable S

Collaboration avec l'Université de Lancaster (Grande Bretagne), Dépt des Sciences Biologiques Laboratoire d'enzymologie moléculaire

Dr. M.R.J. MORGAN
et M. BOUNIAS (Lab. Biochimie)

Le Dr. Morgan a mis l'accent, au cours de son séjour sabbatique de 1989 au LBC, sur la variabilité du paramètre I_{50} (conc. de l'inhibiteur qui réduit de moitié la vitesse initiale) en fonction des concentrations en substrat, alors que cette donnée est souvent traitée par les auteurs comme une constante.

Nous avons établi la relation générale :

$$I_{50}^{hi} = \frac{\left(K_L + L^{h_L} \right)}{\left(\frac{K_L}{K_i} + \frac{L^{h_L}}{K_i'} \right)}$$

dans laquelle L est le ligand, h_L son coefficient de Hill, hi celui de l'inhibiteur, et K_L et K_i leurs constantes de dissociation respectives - (K_i' désigne le cas de la fixation

...

sur le complexe récepteur-ligand -

Le travail en cours a pour but :

1° de mettre en évidence l'influence des divers paramètres sur les courbes de variation de I_{50}

2° de permettre la distinction et le calcul expérimental des coefficients de Hill hi et h'i correspondant à l'interaction de l'inhibiteur avec le récepteur libre ou avec le complexe ligand-récepteur.

- Projet d'ouvrage d'enzymologie -

Un livre d'enzymologie dont le titre provisoire serait : "Que faire d'une activité enzymatique ?"
(What to do with an enzyme kinetic ?)
est en préparation en collaboration avec le Dr Morgan.

Ce livre intégrera une série de données théoriques nouvelles et les moyens de leur mise en pratique par l'utilisateur, avec différents niveaux d'approfondissement, en fonction de la qualification des chercheurs intéressés -

---

8- Régulation biphasique dans les interactions ligands-récepteurs

L'étude théorique déposée sous pli cacheté à l'Académie des Sciences (n° 16411, 1987) a été complétée et généralisée. Un manuscrit a été soumis au "Journal of Enzyme Inhibition" et deux exemples d'applications expérimentales sont proposés à l'Académie des Sciences :

- Le premier concerne l'action du cuivre sur la glycémie de l'abeille et entre dans le cadre des recherches concernant la varroose de l'abeille (thèse de Mme Nectoux : soutenance en 1990)
- Le second montre l'action biphasique du phosphite sur les phosphatases foliaires du poivron (Collaboration avec Mlle Lorient -thèse de 3e cycle- Service du Professeur COULOMB, Université d'Avignon).

V - Hormones.

Deux programmes touchent à leur fin, dans ce domaine : le premier concerne l'action des survivones (acides azélaïque et pimélique) découvertes par le Professeur Rémy Chauvin (Coll. avec la Sorbonne) - La mise en évidence de leur action, à l'échelle biochimique, a été particulièrement évidente. La thèse de Doctorat de M. Jorand, sur ce sujet, n'a pas été soutenue en raison du départ au service militaire de l'intéressé qui, à son retour, a choisi de s'installer comme apiculteur et a renoncé à la recherche.

V.1 - Action des Survivones sur les lipides de l'abeille.

Le manuscrit a été accepté par Hormone and Metabolic Research avec des commentaires élogieux puisque les examinateurs ont considéré que ce travail "ouvrait un nouveau chapitre de l'endocrinologie Comparée".

Il convient de préciser que le laboratoire de biochimie, et l'intéressé, n'ont reçu AUCUN SOUTIEN MATÉRIEL pour ces recherches dont une bonne partie ne sera, vraisemblablement, jamais publiée malgré l'acquisition des résultats.

The "Survival Hormones": Azelaic and Pimelic Acids, Suppress the Stress Elicited by Isolation Conditions on the Steroids and Phospholipids of Adult Worker Honeybees

J. P. Jorand[1], *M. Bounias*[1] *and R. Chauvin*[2]
[1]Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon, Montfavet
[2]Emeritus Professor in Sorbonne, Le Château, Ivoy-le-Pré, France

Summary

The kinetics of abdomen, haemolymph and thoracic-muscle steroid and phospholipid concentrations have been determined in adult worker-bees kept for 0 to 12 hrs starving in darkness, either grouped by 8 (controls) or strictly isolated, or isolated in presence of a piece of cotton impregnated with 1 µg azelaic acid and 1 µg pimelic acid, the so-called "survivones" which restore the lifespan of isolated bees. The dynamics of both steroids and phospholipids strongly deviates in isolated bees relatively to controls. The introduction of survivones completely restored the variations of haemolymph steroids of haemolymph and thorax phospholipids of isolated bees to exactly similar features as in controls. The action of the lipoic hormones "survivones" thus involves the participation of lipid metabolism.

Key-words

Azelaic, Pimelic Acids – Phospholipids – Steroids – Honeybees – Haemolymph – Thorax – Abdomen

Introduction

It has been shown for a long time that the lifespan of the honeybee is much shortened when the insects are kept individually by contrast with bees grouped in appropriate cages (*Grassé* and *Chauvin* 1944). Then, forty years elapsed before *Chauvin* (1984) and *Chauvin, Lafarge* and *Saligot* (1984) discovered two compounds: azelaic and pimelic acids extracted from whole bodies of bees, that might be at least partly responsible for this "group effect" phenomenon. These compounds are able to lengthen the survival of isolated bees and they have been shown to decrease their rate of respiratory exchanges (*Chauvin* 1985), by contrast with the isolation conditions, which elicit a stimulation of the thermic liberation (*Roth* 1965).

Azelaic (nonane, 1,9 dioic) and pimelic (heptane 1,7 dioic) acids have been recently discovered in the brain of adult worker honeybees (*Bounias, Jorand* and *Chauvin* 1987), and might likely represent a new class of hormone-like compounds named "survivones" by *Chauvin* (1981).

The aim of this present work was to compare the kinetic variations of some biochemical compounds involved in the energy metabolism, in bees kept up to 12–13 hrs in defined conditions: either grouped, or isolated, in presence of survivones molecules.

Then, provided an isolation stress is put into evidence, the action of survivones could be observed at a biochemical level. Preliminary experiments have shown that no effect was obtained with trehalosemia and only a weak one with glucosemia, whereas a positive response might be expected for haemolymph phospholipids. In the present work, the variations of the steroid and phospholipid fractions have been reported in the three compartments of the body: the abdomen (mainly gut and fatbody) as stock and synthesis organs, the haemolymph as carrying medium, and the thoracic muscles as energy consuming organs.

Materials and Methods

Adult worker honeybees (*Apis mellifera, mellifera L.*) were collected from the brood combs and pooled by hundreds of individuals in cages.

Batches of 8 bees were separated from the pool in the evening and kept in darkness at 30 ± 1 °C overnight. Basic standards were represented by the original pool. Control series (C) were made with 8 bees gathered together and isolated (I) series with 8 bees kept in separate cages. Lastly, series of 8 isolated bees were kept in cages containing a piece of cotton impregnated with 1 µg of each survivone (I + S). Dark conditions prevented artifacts due to the excitation of bees by the light.

The appropriate number of each series was prepared in order to allow a sample to be collected at 3 hrs intervals from the beginning to a 12–13 delay. About 280 bees were used for the described experiments.

Horm. metabol. Res. 21 (1989) 553–557
© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Received: 4 Oct. 1988 **Accepted: 24 Febr. 1989**

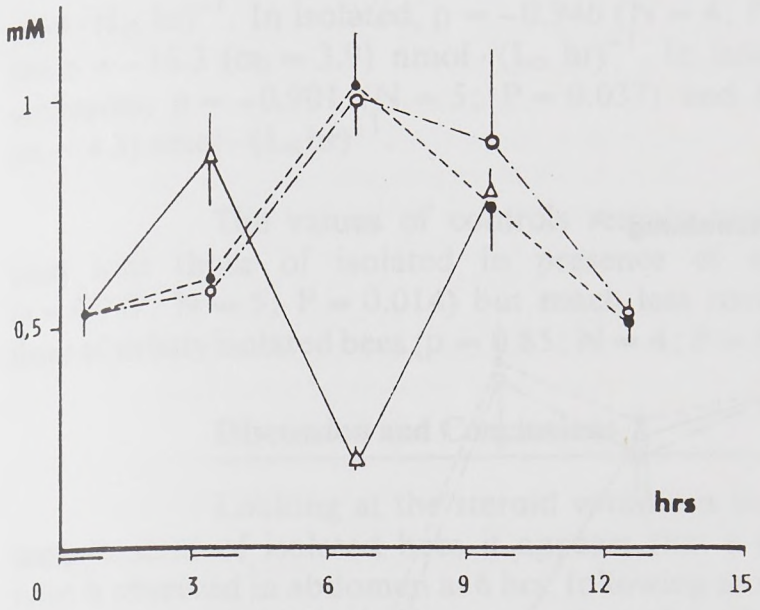


Fig. 1 Kinetics of haemolymph steroid concentrations in control bees grouped by 8 (●---●), strictly isolated (◁——◁) or isolated in presence of survivones (○-·-·-○). Vertical bars are S. D.

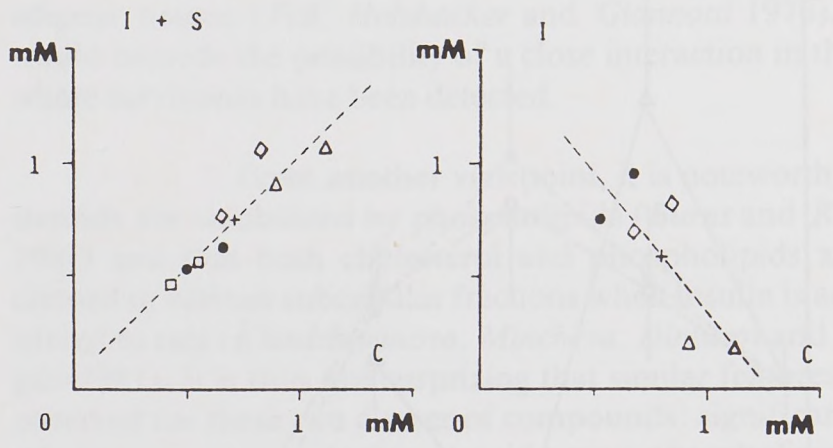


Fig. 2 Correlations between haemolymph steroid concentrations in bees isolated with survivones (I + S) (2-A) or strictly isolated (I) (2-B) versus controls (C).

Table 1 Dynamic of the steroid fraction in the abdomen of honeybees.

Time (hrs)	C	I	I + S
0–1	2.42 ± 0.45	2.42 ± 0.45	2.42 ± 0.45
3–4	2.57 ± 0.28	1.59 ± 0.14	1.72 ± 0.14
6–7	2.27 ± 0.35	2.87 ± 0.13	2.29 ± 0.41
9–10	2.63 ± 0.24	1.76 ± 0.17	2.36 ± 0.27
12–13	2.27 ± 0.37	Death	1.87 ± 0.24

C = controls; I = isolated without survivones; I + S = isolated + survivones (means ± SD nanomols per mg).

Table 2 Dynamic of the steroid fraction in the thorax of honeybees.

Time (hrs)	C	I	I + S
0–1	0.82 ± 0.07	0.82 ± 0.07	0.82 ± 0.07
3–4	0.90 ± 0.17	1.00 ± 0.21	0.86 ± 0.18
6–7	1.01 ± 0.17	1.14 ± 0.06	0.86 ± 0.23
9–10	1.02 ± 0.06	1.24 ± 0.06	0.80 ± 0.04
12–13	1.00 ± 0.04	Death	0.63 ± 0.04

C = controls; I = isolated; I + S = isolated + survivones (means ± SD nanomols per mg).

At the defined time intervals, bees were sampled and the haemolymph first collected using Hamilton micro-syringes. Then the abdomens and thoraces were cut off and frozen after weighing. The haemolymph lipids were first extracted in chloroform-methanol (9-1, v/v) and determined by TLC quantitative methods as previously (*Bounias* 1986).

The thoracic muscles were then dissected and weighed. Muscles and abdomen lipids were extracted with the same solvent, using Potter homogenizers. The dissection operations took an average 46 ± 7 mn for each series of 8 bees. Duplicate determinations of biochemical parameters were performed from each series.

Sampling operations were thus distributed over a one hour interval and the same order was respected so that the same incubation time was respected for each treatment.

The gut and fat body represent 0.36 times the weight of the abdomen (i. e. 17.7 ± 0.6 mg per bee, from 261 determinations), and the dissected muscles 0.51 times the weight of the thorax (i. e. 16.3 ± 0.6 mg per bee, from 275 estimations).

The significances of the comparisons of means, or correlation coefficient values on one hand and of variances, on the other hand, have been respectively calculated from the equations of Student's t-test and Fisher's F-distributions.

ρ = correlation coefficients; b = regression slope; $\sigma^2_b = [(b/\rho)^2 - b^2]/N = 2$; CV = coefficient of variation (σ/x).

Results

In all cases, isolated bees kept without survivones died after 10 hours in too large numbers to allow the experiments to be continued up to 12 hours.

The average weights of the abdomen were 51.1 mg (σ = 4.0 mg; N = 56) in pooled bees, 48.3 mg (σ = 7.7 mg; N = 105) in controls grouped by 8 and 48.2 mg (σ = 6.8 mg; N = 100) in isolated bees. The average weights of thoraces were 32.3 mg (σ = 0.7 mg; N = 56) in pooled bees, 31.0 mg (σ = 1.3 mg; N = 111) in controls and 32.1 mg (σ = 1.7 mg; N = 108) in isolated insects. No statistically significant differences could thus be found between isolated and control bees.

The dynamic of haemolymph steroids is illustrated by Fig. 1. Large amplitude variations are observed up and down from initial values in isolated bees, whereas similar patterns, with a maximum at 6 hrs and a drop back to the original level at 12 hrs, are observed for both controls and isolated in presence of survivones. Fig. 2 illustrates the strong positive correlation between (I + S) and (C) (ρ = 90; N = 8) (P = 0.002; b = 0.98 ± 0.25) and the negative one between (I) and (C) (ρ = −0.77; b = −1.2 ± 0.49) (P = 0.07; N = 6).

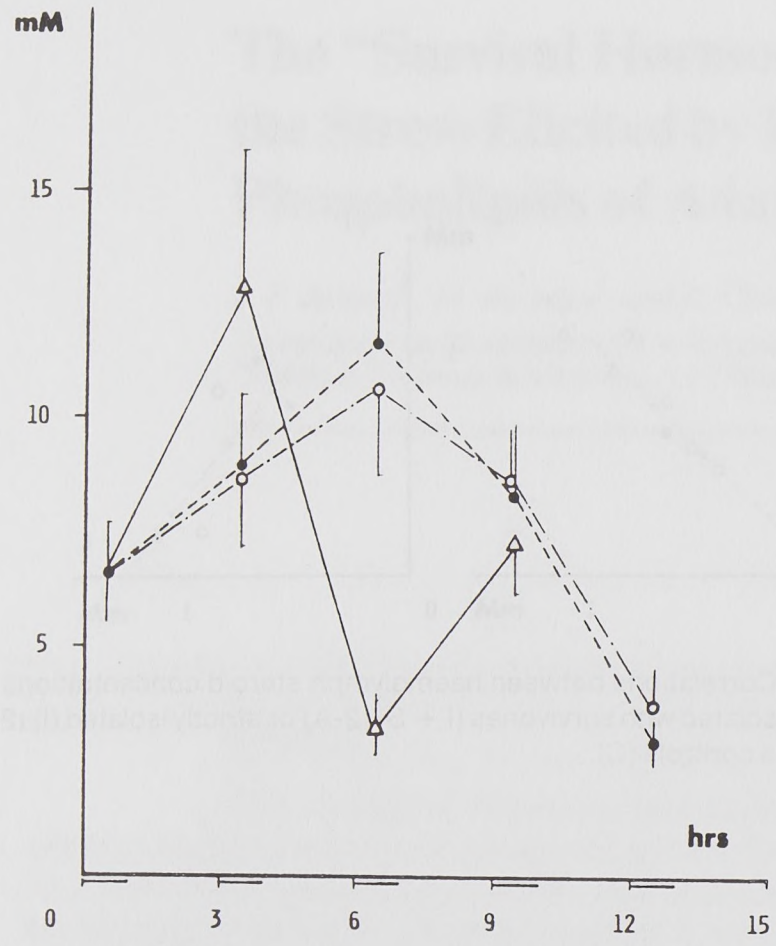


Fig. 3 Kinetics of haemolymph phospholipids in control bees grouped by 8 (●---●), strictly isolated (◁——◁) or isolated in presence of survivones (○-·--·-○). Vertical bars are S. D.

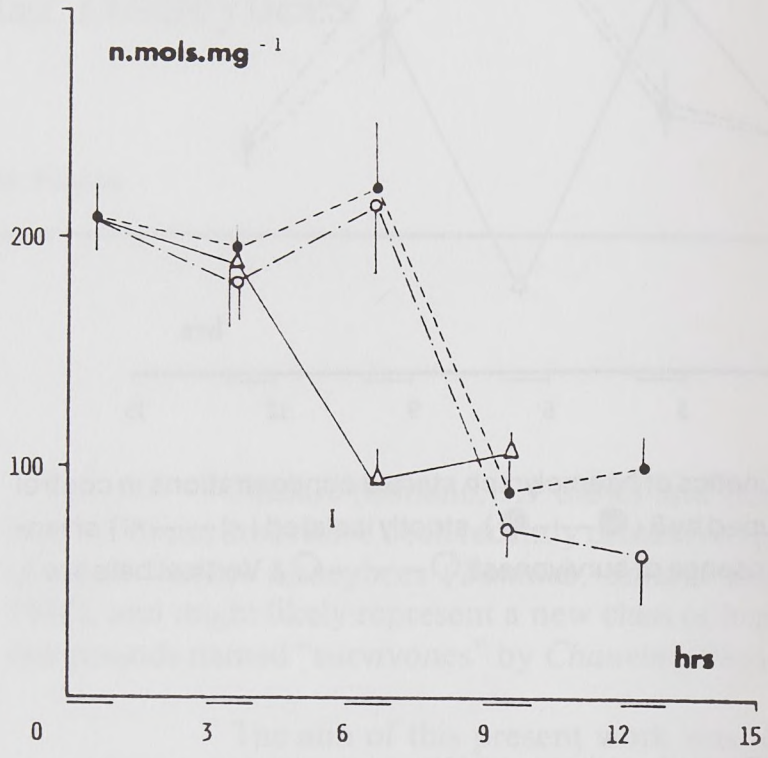


Fig. 4 Kinetics of thoracic-muscles phospholipids in control bees grouped by 8 (●---●), strictly isolated (◁——◁) or isolated in presence of survivones (○-·--·-○). Vertical bars are S. D.

The kinetics of variations of steroids in the abdomen and thorax of bees are given in Tables 1 and 2.

No significant correlation was found in abdomen although the coefficients were weakly negative ($\rho = -0.42$) and positive ($\rho = +0.46$) respectively between (I) or (I + S) and controls.

By comparison with grouped bees, the amplitude of the variations, as estimated by variances, was much higher in isolated ($P = 0.017$) than in isolated in presence of survivones ($P = 0.13$).

In thorax muscles of controls, the steroids concentrations exhibit a slight increase with time, characterized by a strong positive correlation ($\rho = 0.87$; $N = 5$; $P = 0.05$) and a low but significant slope: $b = 0.016$ nanomol $\cdot$ mg^{-1} $\cdot$ hour^{-1} ($\sigma = \pm 0.005$ nmol $\cdot$ mg^{-1} $\cdot$ hr^{-1}). The correlation reaches $\rho = 0.99$ ($N = 4$; $P = 0.01$) in isolated, where the slope is increased: $b = 0.047$ ($\sigma = 0.004$) nanomol $\cdot$ mg^{-1} $\cdot$ hour^{-1}.

The variation is significant at $P = 0.02$. In bees isolated in presence of survivones, the correlation turns negative ($\rho = -0.73$; $N = 5$; $P = 0.16$) with a slope $b = -0.015$ ($\sigma = 0.008$) nmol $\cdot$ mg^{-1} $\cdot$ hr^{-1}. The deviation is significant from controls at $P = 0.058$ and from isolated at $P = 0.004$.

The variations of haemolymph phospholipids are very closely correlated in controls versus isolated with survivones ($\rho = 0.98$; $N = 8$; $P = 2 \cdot 10^{-5}$) and not correlated at all in controls versus isolated bees ($\rho = 0.236$; $N = 6$; $P = 0.96$) (Fig. 3). The kinetics of variations again exhibit a maximum at 6 hrs in controls and isolated with survivones, by contrast with successive deviations up and down from original values in isolated bees.

Table 3 Dynamic of the phospholipid fraction in the abdomen of honeybees.

Time (hrs)	C	I	I + S
0–1	73.2 ± 9.3	73.2 ± 9.3	73.2 ± 9.3
3–4	57.8 ± 15.9	29.0 ± 2.1	40.5 ± 3.2
6–7	52.6 ± 4.6	36.2 ± 2.3	51.6 ± 5.6
9–10	33.0 ± 5.8	23.1 ± 2.2	22.8 ± 0.9
12–13	35.8 ± 8.1	Death	21.4 ± 2.9

C = controls; I = isolated; I + S = isolated + survivones (means ± SD nanomols per mg).

The variations of phospholipids in thoracic muscles are depicted on Fig. 4. A general decrease is observed, but the variations of controls are highly correlated with those of isolated with survivones ($\rho = 0.987$; $N = 8$; $P = 6 \cdot 10^{-6}$) and only poorly with those of strictly isolated bees ($\rho = 0.73$; $N = 6$; $P = 0.09$).

Table 3 gives the concentrations of abdomen phospholipids. As in thorax, a general decrease is observed. Plotting the concentrations versus L_n of time allows a comparison of the respective decays by linear regression.

In controls, the correlation coefficient is $\rho = -0.928$ ($N = 5$; $P = 0.02$) and the slope $b = -11.95$ ($\sigma_b = 2.77$)

nmol · $(L_n\ hr)^{-1}$. In isolated, $\rho = -0.946$ ($N = 4$; $P = 0.054$) and $b = -16.3$ ($\sigma_b = 3.9$) nmol · $(L_n\ hr)^{-1}$. In isolated with survivones, $\rho = -0.901$ ($N = 5$; $P = 0.037$) and $b = -15.4$ ($\sigma_b = 4.3$) nmol · $(L_n\ hr)^{-1}$.

The values of controls remain highly correlated with those of isolated in presence of survivones ($\rho = 0.949$; $N = 5$; $P = 0.014$) but much less strongly with those of strictly isolated bees ($\rho = 0.85$; $N = 4$; $P = 0.15$).

Discussion and Conclusions

Looking at the steroid variations in the three compartments of isolated bees it appears that a maximum value is observed in abdomen at 6 hrs, following an important uptake at 3 hrs and followed by a second uptake at 9 hrs. In the same time, haemolymph concentrations vary in the exactly opposite sense; assuming a total 40 µl haemolymph volume and a total 18 mg organs, the correlation calculation between the total values at 3-6-9 hrs ($N = 3$) gives $\rho = 0.99990$ ($P = 0.01$) and a slope $b = -1.16$ ($\sigma_b = 0.02$) that is an almost equimolar variation. Then, the concentrations in thoracic muscles keep slightly increasing. Haemolymph thus seems to carry from abdomen the appropriate amounts to maintain the thoracic steroid concentrations at a high level. It is noteworthy that in control bees and in isolated with survivones, the observed features are different, leading to respectively constant and decreasing steroid concentrations in thorax, via an exactly correlated dynamic in haemolymph. Abdomen variations were of much lower amplitude in both these two cases ($CV = 0.036$ and 0.096 resp.) than in strictly isolated ($CV = 0.48$). The action of survivones thus has spectacularly restored the deviation elicited by the isolation stress.

The variations of abdomen phospholipids exhibit a dynamic of exhaustion, in consistency with the fact that the animals are starving over the whole experimental period. The rate of the decrease is maximum in strictly isolated bees, but not in a significantly different way from those isolated with survivones.

The haemolymph concentrations keep at a rather high level up to 12 hrs but, again, larger amplitude variations occur in isolated bees which significantly deviate from controls, whereas normal variations are significantly restored by the addition of survivones.

It seems presently unlikely that the observed variations are under the control of aminergic effectors, as this is the case in vertebrates (*Khadzhivanova, Kumanov, Neicheva, Dimitrov* and *Georgiev* 1979) since neither noradrenaline nor octopamine (*Bounias* 1986; 1988) have important effects on phospholipids and steroids.

Steroids are involved as components of lipid-carrier proteins (*Chino* 1981) which are present in honeybees as large molecular weight lipophorins with several apolipoproteins (*Robbs, Steven, Ryan, Schmidt, Keim* and *Law* 1985). But in vertebrates, they are also known to inhibit glucose transport, by competitive binding on sites of the carriers which are exposed on erythrocytes membranes (*Krupka* and *Deves* 1980).

Although such a mechanism has not yet been studied in insects, it is likely that steroids are involved at several steps of energy metabolism. Moreover, the central nervous tissues of insects are able to release steroids, as well as adipose tissues (*Fell, Holzhacker* and *Giannotti* 1976). This would provide the possibility of a close interaction in the site where survivones have been detected.

From another viewpoint, it is noteworthy that steroids are solubilized by phospholipids (*Burns* and *Roberts* 1981) and that both cholesterol and phospholipids are increased in various subcellular fractions when insulin is administered to rats (*Khadzhivanova, Mincheva, Dimitrov* and *Georgiev* 1981). It is thus not surprizing that similar features were observed for these two classes of compounds: significant correlations appear by plotting steroid versus phospholipid concentrations from 3 hrs to 12 hrs in controls ($\rho = 0.827$; $N = 8$; $P = 0.01$) and isolated with survivones ($\rho = 0.730$; $N = 8$; $P = 0.04$) as well as strictly isolated bees ($\rho = 0.875$; $N = 6$; $P = 0.02$).

Phospholipids are particularly concentrated in insects' red muscles (*Novakova, Novak* and *Kubista* 1976) in correlation with flight and in connection with the formation of new mitochondrial membranes (*Helm, Novak, Sula, Novakova* and *Kubista* 1977). It can then be expected that environmental temperature will play a part in the expression of survivone effects, since it exerts an influence on the mitochondrial lipid composition of flight muscles (*Kallapur, Downer, George* and *Thompson* 1982).

The lipid versus carbohydrate relationship, as previously evidenced following the injection of an insulin-like peptide (*Bounias, Moreau* and *Gourdoux* 1985) might also be involved in the mechanism of survivone action. It is noteworthy that under the stress of the insulin-releasing drug glibenclamide, the honeybees haemolymph carbohydrates concentrations dramatically dropped following a forced walk (*Maier, Fuchs, Mezger, Herlitzius* and *Pfeiffer* 1987). One of the possible modes of action of survivones could be to prevent the deprivation of available energy fuels that occur in adverse environmental and physiological conditions. Then it appears that the role of the period of the day at which bees are isolated should have to be more thoroughly elucidated. At the present stage of our investigations, it appears that the effect of survivones is more marked during the night, i. e. at a period where the mortality rate of bees is lower. This phenomenon remains a challenging question, since bees were always kept in darkness, and should be matter of further investigations.

Acknowledgements

Many thanks are due to Prof. Dr. Maier for his kind encouragement and advice.

References

Bounias, M.: Noradrenaline, propranolol and adrenochrome interactions with the dynamic of haemolymph lipids in worker honeybees. Horm. Metab. Res. 18: 804–810 (1986)

Bounias, M.: Interaction du propranolol et de la somatostatine avec la réponse octopaminergique de la lipémie de l'abeille *in vivo*. C. R. Soc. Biol. 182: 37–43 (1988)

Bounias, M., R. Moreau, L. Gourdoux: Une inter-relation entre glucose et acides gras, induite dans l'hémolymphe d'abeilles par l'injection d'insuline spécifique et supprimée par la somatostatine de vertébrés. C. R. Acad. Sc. (Paris), 300 III: 623–626 (1985)

Bounias, M., J. P. Jorand, R. Chauvin: Localisation chimique de l'acide azélaïque, facteur de survie des abeilles isolées, dans le cerveau de l'abeille ouvrière. C. R. Acad. Sc. III 304: 79–82 (1987)

Burns, R. A., M. F. Roberts: Cholesterol solubilization by short-chain lecithins: characterization of mixed micelles and cholesterol oxidase activity. Biochemistry 20: 7102–7108 (1981)

Chauvin, R.: La survivone, substance qui induit la survie chez les abeilles isolées. Ins. Soc. 18: 161–172 (1981)

Chauvin, R.: Le mécanisme de l'action des substances de survie des abeilles isolées. C. R. Acad. Sc. (Paris) 299D: 647–650 (1984)

Chauvin, R., J. P. Lafarge, J. P. Saligot: Identification chimique des substances de survie des abeilles isolées. C. R. Acad. Sc. (Paris) 299D: 603–606 (1984)

Chauvin, R.: L'intervention d'une hormone, la survivone, dans la mortalié des abeilles isolées (effet de groupe). Apidologie 16: 77–88 (1985)

Chauvin, R.: Précisions sur le mode d'action des constituants de la survivone des abeilles. Ins. Soc. 32: 209–212 (1985)

Chauvin, R., Y. Girardot: Sur l'organe émetteur de la survivone, hormone de survie des abeilles isolées. C. R. Acad. Sc. (Paris) 301 III: 631–633 (1985)

Chino, H.: Lipid transport by hemolymph lipoproteins. In: R. G. H. Downer, Energy Metabolism in Insects. Plenum Press: 155–167 (1981)

Fell, D., E. L. Holzhacker, O. Giannotti: Chemical study of substances liberated by the central nervous system and adipose tissue of *Periplaneta americana* L. Arq. Inst. Biol. Sao Paulo 43: 115–120 (1976)

Grassé, P. P., R. Chauvin: L'effet de groupe et la survie des neutres dans les sociétés animales. Rev. Sc. 7: 461–464 (1944)

Helm, R., F. Novak, J. Sula, O. Novakova, V. Kubista: Phospholipid metabolism in the flight muscle of *Periplaneta americana* during maturation. Insect Biochem. 7: 73–76 (1977)

Kallapur, V. L., R. G. H. Downer, J. C. George, J. E. Thompson: Effect of environmental temperature on the phase properties and lipid composition of flight muscle mitochondria of *Schistocerca gregaria*. Insect Biochem. 12: 115–121 (1982)

Khadzhivanova, N., K. Kumanov, T. Neicheva, T. Dimitrov, G. Georgiev: The role of adrenaline in lung phospholipid biosynthesis. Dokl. Bolg. Akad. Nauk. 32: 993–996 (1979)

Khadzhivanova, N., R. Mincheva, G. Dimitrov, G. Georgiev: Insulin effect on lung subcellular fraction phospholipids and cholesterol. Clin. Respir. Physiol. 17: 53–64 (1981)

Krupka, R. M., R. Deves: Asymmetric binding of steroids to internal and external sites in the glucose carrier of erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta 598: 134–144 (1980)

Maier, V., J. Fuchs, M. Mezger, H. Herlitzius, E. F. Pfeiffer: Effect of glibenclamide on carbohydrate levels in the haemolymph of the honeybee (*Apis mellifica*). Diabetologia 30: 553 (1987)

Novakova, O., F. Novak, V. Kubista: Phospholipid metabolism in red and white insect muscle. Insect Biochem. 6: 381–384 (1976)

Robbs, L., L. Steven, O. R. Ryan, J. O. Schmid, P. S. Keim, J. H. Law: Lipophorin of the larval honeybee, *Apis mellifera L.* J. Lipid Res. 26: 241–247 (1985)

Roth, M.: La production de chaleur chez *Apis mellifica*. Ann. Abeille 8: 5–77 (1965)

Requests for reprints should be addressed to:

Prof. Dr. M. Bounias

Laboratoire de Biochimie
INRA-Avignon BP 91
F-84140 Montfavet (France)

V.2 - Action du glucagon chez l'abeille -

Collaboration avec l'Allemagne - (Prof. Dr. V. Maier)*

Le programme de collaboration avec l'Allemagne sur la comparaison des effets respectifs du glucagon endogène et du glucagon de vertébrés, a abouti à la préparation en commun d'un manuscrit intitulé :

"Glucagon as a non species-specific regulator of the honey bee glycemia" -

par V. Maier, J. Fuchs, E.F. Pfeiffer et M. Bounias

dont la rédaction a eu lieu en juillet 1989 à l'Université d'Ulm (RFA) lors du séjour effectué par M. Bounias dans le cadre du programme PROCOPE -

● En même temps que le manuscrit était accepté dans "Diabète et Métabolisme" et que M. Fuchs soutenait sa thèse, nous apprenions que la commission PROCOPE rejetait sélectivement notre demande de renouvellement, parmi toutes celles présentées -

Les voies des "décideurs" sont impénétrables...

Le programme se poursuivra, néanmoins, en 1990 avec l'exploration du système insulinergique !

(*) Université d'Ulm, Klinikum der Universität.
Je remercie vivement son directeur, le Prof. Dr. Maier, pour son très amical accueil à Ulm

VI Homéostasie de la glycémie chez l'Abeille _

Deux aspects ont été traités, en 1989 _

1 _ Influence de la phase lunaire _

Le projet de recherches sur l'héritabilité de la glycémie, élaboré par la zoologie (DEA de Mlle Mohssine) n'avait pas abouti, du fait que les glycémies à comparer étaient trop homogènes, provenant de reines d'une même race _

En revanche, le programme de calculs réorienté vers l'étude de l'influence du cycle lunaire sur la glycémie initiale des naissantes, a donné des résultats positifs _

Un mémoire intitulé :

"Lunar phase influence on the glycemia of Worker honeybees"

par H. Mohssine, M. Bounias et J. M. Cornuet

a été soumis à la revue internationale spécialisée :

"Chronobiologia"

(VI - Homéostasie de la glycémie, suite)

2 - Variations homéostasiques et thanatologiques de la tréhalosémie et de la glucosémie des larves du 5e stade placées hors de leurs alvéoles.

Collaboration avec la Yougoslavie.

Ce travail constitue une partie de la thèse Ph. D. préparée au Laboratoire de Biochimie par Mme Debevec (Univ. de Belgrade, Fac. de Méd. Vétér., Chaire et Dépt de Biologie : Prof. Dr. D.S. Popesković).

Il constitue une partie de la "banque" de données de base nécessaires pour apprécier l'influence de toxiques au niveau des larves.

116

Acta Veterinaria (Beograd), Vol. 39, No 4, 227—234, 1989

UDK 619:615.099.036:638.1

HOMEOSTASIC AND THANATOLOGICAL VARIATIONS OF HAEMOLYMPH TREHALOSE AND GLUCOSE IN 5th INSTAR LARVAE OF HONEYBEES KEPT OUT OF THEIR ALVEOLI

MIRJANA DEBEVC and D. POPESKOVIĆ

Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine P.O. Box 370, 11000 Beograd, Yugoslavia

M. BOUNIAS

Laboratory of Biochemistry, INRA — Avignon. B. P. 91, F 84140 Montfavet, France

(Received, 12 June 1989)

Trehalose and glucose concentrations have been studied in the haemolymph of 5th instar larvae of honeybees kept in glass dishes at 20° C and at 7° C. An increase of trehalose and glucose concentrations was observed in both cases at 6 hrs. The levels then remained rather stable at 7° C up to 24 hrs, with a normal, positively sloped relationship between trehalose and glucose. However, a depression of trehalose is observed together with a strong increase of glucose from 120 hr at 7° C and in larvae showing symptoms of agony, suggesting a stimulation of trehalase activities. These data provide a satisfactory basis for further toxicological studies using the changes of glucose concentration as a biochemical parameters for further toxicological studies.

INTRODUCTION

The general use of pesticides in agriculture has, for a long time, brought about the problem of their toxicity to honey bees (Johanson, 1966). Then, in recent past years, the infestation of hives with the parasite mite *Varroa jacobsoni* has introduced the additional risk of treatments with miticides, which are also insecticides, inside the hives (Kulinčević et al., 1988, 1989). In this latter case, the larvae of workerbees are directly exposed to the toxic agents at least up to the end of the 5th instar, just before the operculation of the mature larvae, prior to their metamorphosis into a pre-nymph (Lensky, 1971).

Toxicological studies on honey bee larvae are most difficult to perform *in situ* and it thus appeared useful to examine the behaviour of larvae selected at the 5th instar, where they no longer feed, and are kept *in vitro* in controlled conditions in the laboratory.

Provided stability of the biochemical characteristics of the insects is observed for a long enough time, such artificial conditions could be used as a convenient way of studying the toxicity of xenobiotics to honey bee larvae.

Previous work (Bounias, et al., 1988) has given evidence that some lipid components can be appropriately considered for such a purpose. This appeared the most important as it had been shown that a pyrethroid pesticide is able to elicit very large deviations of lipid metabolism in worker bees (Bounias, et al., 1984). On the other hand, the formamidine acaricide Amitraz, used against the Varroa mite, acts as an α-adrenergic hyperglycemic effector (Cascino, et al., 1989). These observations therefore prompted us to examine the stability of glycemia, as a potential toxicological index, in honey bee 5th instar larvae kept in artificial conditions in the laboratory.

MATERIAL AND METHODS

Larvae of Apis mellifera, mellifera workers, were extracted from the alveoli at the 5th instar, using soft forceps, and then introduced in groups of five in small glass Petri dishes of 5 cm ∅.

The average individual weight of the larvae was 130 ± 10 mg. A first batch was placed at a constant temperature of $20 \pm 1^\circ$ C and another at $7 \pm 0.5^\circ$ C. Samples were taken in both conditions after 1 hr, 3 hr, and 6 hr and then, in the groups kept at 7° C, after 1, 2, 4, 5 and 6 days. Controls were sampled from honeybees directly collected in the hive, i.e. nearly at 32° C. The symptoms of agony, which can be discerned at the end of the 1st day at 20° C and from 5th to the 6th day at 7° C have been previously described (Bounias, et al., 1988).

The haemolymph of normal looking or near to death larvae was punctured out using Hamilton microsyringes. An average 26 ± 4 µl was obtained from each larva. Proteins were precipitated by adding to an aliquot the same volume of a mixture composed of ethanol and pyridine (4—1 v/v), then centrifuging for 5 min at 5000 x g.

The separation and quantitation of carbohydrates was achieved by chromatographic methods, as described previously (Bounias, 1976, Bounias, 1983). For each treatment, duplicate determinations were performed from samples of 5 larvae. The probabilities of significances (P) linked to the comparisons of means and to the values of correlation coefficients, were determined using the distribution of Student's "t" variable.

Functional relationships were characterized using the regression parameters computed from the last rectangle methods valid for two aleatory variables. Slopes are designed by $d = \sigma y / \sigma x$ (σy, σx are S. D. of each variable) and their SD is given by the relation: $\sigma d = d^2 (1 - \rho)/\gamma$, with

Acta Veterinaria (Beograd), Vol. 39, No 4, 227—234, 1989

ρ = correlation coefficient and γ degree of freedom = N-2 (N, number of pairs of data).

RESULTS

Table 1. indicates the data obtained from larvae kept at 20° C. Trehalose, glucose and fructose were found as the three major compounds, as previously shown (Bounias, 1978). Trehalose levels rapidly increased to significantly higher levels from 3 hr to 6 hr, whereas glucose levels were increased only at 6 hr. Fructose concentrations exhibited a large variability and thus failed to vary significantly.

Table 1. Variations of haemolymph carbohydrate contents in Vth instar honeybee larvae kept at 20°C. Means ± S.D. are expressed in m mol/l

	Trehalose	Glucose	Fructose
Controls	25.7± 3.5	2.8±0.3	1.1±0.4
1 hr	50.0± 7.7	3.7±0.1	1.1±0.1
3 hr	75.8± 0.5[b]	2.7±0.3	2.4±0.04[a]
6 hr	94.9±19.9[b]	9.7±0.8[b]	3.4±0.7

Significant increase: ([a]) at $P \leq 0.06$ ([b]) at $P \leq 0.01$

Table 2. gives the results obtained at 7° C. As previously, trehalose concentrations rapidly increased and remained at a significantly higher level than controls up to 120 hr where the trehalosemia came back to the initial level. By contrast, glucose levels exhibited a continuous increase from 48 hr to 120 hr. Fructose levels were generally not significantly affected in our experimental conditions.

Table 2. Variations of haemolymph carbohydrate contents in Vth instar honeybee larvae kept at 7°C. Means ± S.D. are expressed in m mol/l

	Trehalose	Glucose	Fructose
Controls	25.7± 3.5	2.8±0.3	1.1 ±0.4
1 hr	54.0± 4.0[a]	2.4±0.1	1.3 ±0.1
3 hr	90.7± 5.6[b]	5.8±0.5[b]	4.1 ±0.1[b]
6 hr	97.6±21.2[a]	5.6±0.5[a]	3.1 ±0.7
24 hr	77.8± 5.4	3.2±0.8	0.14±0.01
48 hr	74.2± 1.6	13.3±1.6[b]	0.37±0.08
96 hr	59.3± 7.6[a]	14.3±1.2[b]	0.71±0.11
120 hr	34.3±14.1	16.2±0.7[b]	0.43±0.11

Significant increase: ([a]) at $P \leq 0.05$ ([b]) at $P \leq 0.02$

Typical agony symptoms were observed in an increasing manner at 120 hr (stage 1) and 144 hr (stage 2). The corresponding glycemia are given in Table 3. It is noteworthy that the maximum increase of glucose was accompanied by a significant drop of trehalose concentrations.

Table 3. Haemolymph carbohydrate contents in arlvae at two successive stages of agony. Means ± SD are given in m mol/l

	Trehalose	Glucose	Fructose
Controls	25.7± 3.5	2.8±0.3	1.1±0.4
Stage 1	33.7±13.2	21.0±2.3[a]	0.3±0.1
Stage 3	10.8± 1.0[b]	67.2±7.7[a]	0.5±0.2

([a]) Significant increase at $P \leq 0.01$
([b]) Significant decrease at $P = 0.04$

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The haemolymph concentrations of trehalose and glucose exhibited up to 24 hr at 7° C, a parallel increase characterized by a positive correlation (fig. 1A) for N=12. Plotting glucose versus trehalose levels gives $\rho=0.84$ ($P<0.01$) $d=0.04+0.007$. This is a characteristic feature of normal larvae (Bounias, 1978) and one may consider the increased but stable trehalose levels as resulting from the unnatural conditions in which the larvae were kept.

That this increase results from an hormonal induced increase of trehalosemia, for instance through a sustained adrenergic stimulation (Bounias, et al., 1979) presently remains a matter of speculation.

By contrast, a negative corelation (Figure 1B) clearly appears from 24 hr to 144 hr at 7° C, i.e. including the near-death (agony) stages: for N=12 pairs of data, $\rho = -0.795$ ($P \sim 0.005$); $d=0.83\pm0.16$. This finding suggests that the hydrolysis of trehalose could be stimulated in the second phase of the experiment, markedly starting at 120 hr.

This subdivision into two distinct phases might indicate that from 0 to 24 hr, the larval characteristics are maintained, whereas the physiology of prenymphs becomes apparently predominant after 24 hr. In effect, similar features as in Figure 1A and 1B have been respectively identified in 5th instar larvae and in prenymphs kept in natural conditions, i.e. in their frame combs.

It is likely that a stimulation of trehalase activity could be involved in the negative correlation between trehalose and glucose after day 24. We have, therefore, run a series of experiments in order to study, in the same conditions, the full kinetic properties of the enzyme. Among the various possible hypotheses, one may consider that an induction or release of previously stocked enzyme molecules will elicit a selective increase of

Acta Veterinaria (Beograd), Vol. 39, No 4, 227—234, 1989

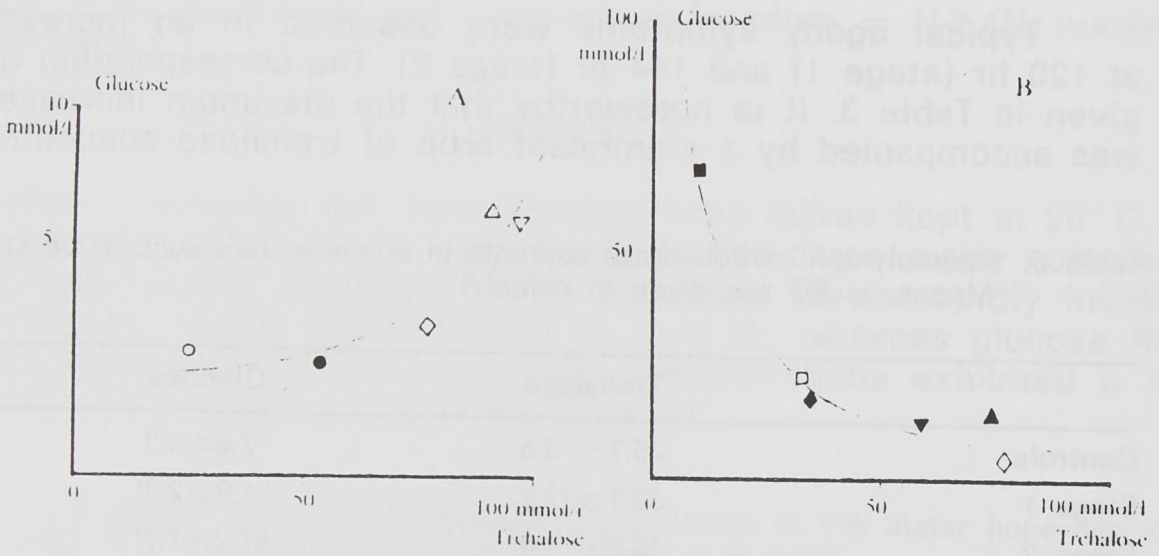


Figure 1. Correlations between glucose vs trehalose concentrations in the haemolymph of 5th instar larvae of honeybees: A = from 0—24 hr; B = from 24 hr to 144 hrs — (O) controls; (●) 1 hr; (△) 3 hr; (▽) 6 hr; (◇) 24 hr; (▲) 48 hr; (▼) 96 hr; 120 hr; (◆) agony stage 1 at 120 hr; (□) agony stage 2 at 144 hr.

the maximum velocity, whereas a molecular activation involving a change in th active site structure will result in a modification (i.e. a decrease) of the dissociation constant and possibly some changes of the Hill coefficient. The results of our investigations, presently in progress, will be presented in separate communications.

The observed stability observed from 1 hr to 24 hr for both trehalose and glucose concentrations shows that these parameters could be used as toxicological symptoms in further studies. Keeping the larvae at 7° C allows a much longer time to be available for this kind of experiments, which should be considered a substantial advantage. It allows a longer delay after administration of the toxic agents.

It is interesting to note, however, that the short term variations from 1 hr to 3 hr look quite similar at 20° C and 7° C. The correlation calculation

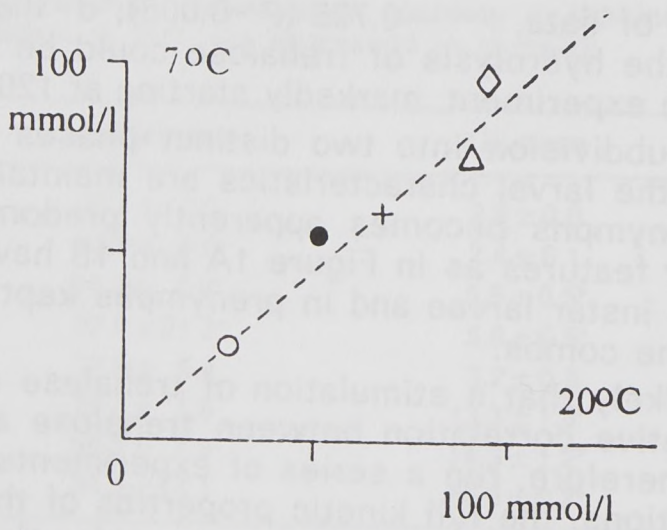


Figure 2. Correlations between trehalose concentrations observed in the haemolymph of 5th instar larvae of honeybees at 7°C vs 20°C.

plotted for 20° C versus 7° C values of trehalose gives, for N=4 pairs of data: $\rho=0.984$ ($P=0.015$), $d=1.0\pm0.1$, that is an equi molecular evolution (Figure 2). This means that short term toxicological studies could also be run from 1—3 hr after treatment, even nearly at room temperature, without the risk of agony symptoms coming across the effects of the treatments.

Continuation of this work will now bring the required additional information concerning the variations of α-glucosidase parameters in the same conditions, and the whole results will hopefully provide a useful basis for further research on pesticide effects on honeybee larvae.

REFERENCES

Bounias, M. 1976. Micro-analyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes. I-Les glucides libres. *Analusis, 4,* 87—93.

Bounias, M. 1978. Intraglycemic relations occuring during the development of Honey bees workers. *Comp. Biochem. Phisiol. 61A,* 13—18.

Bounias, M. and Pacheco, H. 1979. Effects hyperglycémiants de l'adrénaline injectée chez l'abeille in vivo. *C. R. Acad. Pres. (Paris) 289 D,* 33—36.

Bounias, M., 1983. L'analyse Biochimique Quantitative par Nano-Chromatografie en couche mince. *Masson Ed.*, 205.

Bounias, M., Dujin, N. and Popesković, D. 1984. Effects of sublethal doses of a synthetic pyrethroid: deltamethrin, on the glycemia, the lipemia and the gut alk. phosphatases on the honey bee. *Pestic. Biochem. Physiol., 24,* 149—160.

Bounias, M., Debevec, M. and Popesković, D. 1988. Manifestation homéostatiques et thanatologiques de la lipémie des larves d'abeilles du 5e stade conservées hors de leurs alveoles. *C. R. Soc. Biol., 182,* 479—486.

Cascino, P., Nectoux, M., Guiraud, G., and Bounias, M. 1989. The formamidine amitraz as an hyperglycemia α — agonist in worker honey bees, in vivo. *Biomed. Environ. Sci., in press.*

Johanson, C. A. 1966. Digest on bee poisoning; its effect and preservation with an annotated list of 92 insecticides Bee World 47, pp 5—25.

Kulinčević, J. M. and Tomažin, F. 1988. Termochemical control of Varroa jacobsoni with minimal application of Amitraz. *European Research of Varroatosis Control. Ed. by R. Cavalloro, Communities, Joint Research Centre, Ispra. Published by A. A. Balnema (Rotterdam — Brookfield).*

Kulinčević, J. M., Rinderer, T. E., Mladjan, V. J. and Buco, S. M. 1989. Control of Varroa jacobsoni in honey bee coloniesin Yugoslavia by fumigation with low doses of fluvalinat or amitraz *Apidologie (recived for press).*

Lensky, Y. 1971b. Haemolymph proteins of honey bee. II-Differentiation during the development of bee workers. *Comp. Biochem. Physiol. 39,* 335—341.

Acta Veterinaria (Beograd), Vol. 39, No 4, 227—234, 1989

KONCENTRACIJA GLUKOZE I TREHALOZE U HEMOLIMFI PETOG UZRASNOG STADIJUMA LARVE PČELA, ČUVANIH U PETRIJEVIM ŠOLJAMA

MIRJANA DEBEVC, D. POPESKOVIĆ i M. BOUNIAS

SADRŽAJ

Proučavana je koncentracija glukoze i trehaloze u hemolimfi petog uzrasnog stadijuma larve pčela, čuvanih u Petrijevim šoljama no 20° C i 7° C. Povećanje koncentracije glukoze i trehaloze je uočeno u oba slučaja posle 6 h. Nivoi se zatim održavaju prilično stabilno na 7° C do 24 h, sa normalnom, pozitivnom krivom odnosa između trehaloze i glukoze. Međutim, primećeno je smanjenje trehaloze, zajedno sa snažnim povećanjem glukoze od 120 h na 7° C, i u larvama koje pokazuju simptome agonije, koje sugerira na stimulaciju trehalazne aktivnosti. Ovi rezultati obezbeđuju zadovoljavajuću bazu za dalja toksikološka ispitivanja upotrebljavajući promenu koncentracije glukoze kao biohemijskog parametra za određivanje toksičnog stanja.

VII _ Toxicologie générale

Théorie de la létalité

La toxicité des substances xénobiotiques est, malheureusement, encore trop souvent évaluée à partir de critères de létalité, et en particulier la DL_{50}, dont la validité est de plus en plus contestée _

Après la publication du travail sur le recours à l'équation de Hill en toxicologie générale (M.BOUNIAS, 1990, Fundam. Clin. Pharmacol., 3(1), 1-9), une étude complète a été réalisée, afin de replacer l'ensemble du problème de la caractérisation de la létalité dans un cadre algébrique cohérent _

Cette étude a permis de fournir des preuves mathématiques de l'inadéquation de la DL_{50} et de proposer plusieurs paramètres nouveaux doués, quant à eux, des propriétés de véritables constantes, indépendantes de tout choix arbitraire de l'expérimentateur _ (Colloque Soc. Biol. et Chimie Biol., Montpellier) _

Les résultats remettent en cause les pratiques toxicologiques habituelles

L'analyse du modèle se poursuit vers divers aspects complémentaires, tels que la comparaison des procédés d'intoxications dites "aigues" ou "chroniques" _

Derivation of Actual Toxicological Constants in Lethality Studies

MICHEL BOUNIAS
Laboratory of Biochemistry, University & INRA-Avignon,
B.P. 91, F84140 Montfavet, France

Reçu le 27 juillet 1989

SUMMARY

Considering the inadequacy of the LD_{50} as a parameter subject to wide variability according to a purely arbitrary choice of time, an integrated model is proposed, which allows the definition of actual constants characteristic of the lethal action of a toxic. Mortalities as saturation functions of time ($M_i = 100/(1+[T_i/t]^{n_i})$), allow two parameters : $T_i = LT_{50i}$ = time corresponding to 50% mortality, and n_i = Hill coefficient, to be easily and accurately calculated and replotted in turn as similar saturation functions of doses d_i. These parameters, together with the mortality rates determined at 50% mortality or at inflexion point (i.e. the maximum one, existing when $n_i > 1$), allow a set of constants to be defined : doses giving half-maximum of the variations of each parameter, and the corresponding Hill coefficients. The model also describes the variations of LD_{50} versus time and allows a better treatment of dose/mortality studies at fixed times. It is concluded that only minor differences would emerge between acute and chronic toxicology and that the major condition, in the future, is that mortalities should be monitored over the whole lifespan of the studied subjects.

Formulation des véritables constantes toxicologiques destinées aux études de létalité.

RESUME

La DL_{50} est un paramètre tributaire d'une très grande variabilité, sous la dépendance d'un choix purement arbitraire du temps. Le modèle général proposé conduit à la définition algébrique des véritables constantes caractéristiques des effets létaux d'un toxique. Les mortalités sont exprimées selon une fonction de saturation du temps : $M_i = 100/[1+(T_i/t)^{n_i}]$ qui permet de calculer deux paramètres, T_i et n_i, eux-mêmes fonction des doses (d_i) selon le même type d'équation : $T_i = TL_{50i}$ est le temps correspondant à 50% de mortalité et n_i est le coefficient de HILL précisant la morphologie algébrique de la réponse. A ces deux paramètres, s'ajoutent deux autres (Δ) définis par les vitesses de mortalité observées à M_i=50% et au point d'inflexion dans le cas de courbes sigmoïdes (vitesses maximale définie si $n_i > 1$) qui obéissent également à l'équation de Hill. Leurs valeurs respectives permettent de définir autant de constantes algébriques, à savoir : les doses dT_{50}, dN_{50}, $d\Delta_{50}$, provoquant une variation de T_i, n_i, Δ_i, égale à la moitié de la variation maximale possible, ainsi que les coefficients de HILL correspondants. Le modèle décrit également les variations de la DL_{50} en fonction du temps et permet un traitement plus précis des relations doses/mortalités à un temps donné. Il apparaît qu'il n'existe pas de différence majeure entre toxicité aigüe et chronique, et que dans l'avenir, les mortalités devraient être observées pendant toute la durée de vie des sujets, afin de permettre une analyse objective des résultats.

1. Introduction

The need for toxicological constants that could be used as universal parameters led to the concept of LD_{50} as early as the years 1920s (Trevan, 1927). Several theoretical basis were then proposed, the most largely known being the probits model (Finney, 1947). It is noteworthy that the principle that drove Finney's choice was just an arbitrary decision : "No suggestion of absolute truth is intended here, any more than in other uses of the normal distribution in statistical science, and alternative distributions may be proposed (...)". (Finney, 1950).

Most of the other proposed models, such as logits or Weibull (see : Christensen and Nyholm, 1984 for review) are based on similar considerations and obey a general equation of the following type :

$$R=\epsilon+Ro.\exp.\{-(f/\sigma)^m\} \qquad (1)$$

in which R is the response to factor f (here a dose), Ro the response at F=0, ϵ a residual factor, σ a distribution parameter and m a coefficient of shape.

The LD_{50} has been subsequently deduced from linear transformations (Miller & Tainter, 1944, Litchfield & Wilcoxon, 1949) with the introduction of more or less numerous weighting factors (see Bliss method, in : Valette, 1972). However, in the recent past years, a number of criticism have been successively pointed out, both on the inadequacy of the LD_{50} itself as a toxicological parameter (Mehlmann et al., 1976 ; Zbinden & Flury-Roversi, 1981 ; Chanter & Heywood, 1982) and on the conversion methods (Hamilton, 1977).

We have recently proposed an alternative way allowing a simple and convenient plotting of the dose/effect relationships using the Hill equation (Bounias, 1989). This deterministic basis, by contrast with the probabilistic ones, offers the advantage of accounting for both sigmoidal and hyperbolic-shaped responses, and to allow a simple and accurate determination of the saturation limit of the response, when

necessary. The aim of the present work is to propose an integrated treatment of the various toxicological responses, and to derive from the model the expression of the actual toxicological constants that could be proposed as alternatives to the LD_{50} which, indeed, appears as a wide amplitude variable from the theoretical study, in agreement with control experiments.

2. The basic equation

One single equation will account for all the described events :

$$R = R_\varepsilon + (R_{max} - R_\varepsilon).\Phi_R \qquad (2)$$

R the response at factor f, R_ε a residual value, R_{max} the asymptotic extremum (maximum or minimum) and Φ_R a saturation fraction of the form :

$$\Phi_R = (1+[F/f]^n)^{-1} \qquad (3)$$

f the factor, F the value of f giving half saturation response, and n the shape coefficient. Then, F and n can, in turn, appear as subvariables obeying an equation of the same type as equation (2), involving the corresponding saturation fractions Φ_F and Φ_n as in equation (3).

2.1 - Mortality as a function of time. Let M_i the observed mortality % versus time t at dose d_i of toxic. Since $M_{max} = M_{max} = 100\%$ as far as conceivable for living organisms :

$$M_i = M_\varepsilon + (100 - M_\varepsilon)/(1+[T_i/t]^{n_i}) \qquad (4)$$

M_ε the initial mortality (nearly still-born subjects) ; $T_i = (LT_{50})_i$ = time after which 50% of the individuals are dead, including $T_o = (LT_{50})_o$ in control samples, i.e. with do=0 ; n_i = Hill coefficient of Φ_M.

Let $M_i = 100.(M_i - M_\varepsilon)/(100 - M_\varepsilon)$ for simplification in further considerations. Then, as illustrated by fig. 1 :

$$M_i = 100/(1+[T_i/t]^{n_i}) \qquad (4')$$

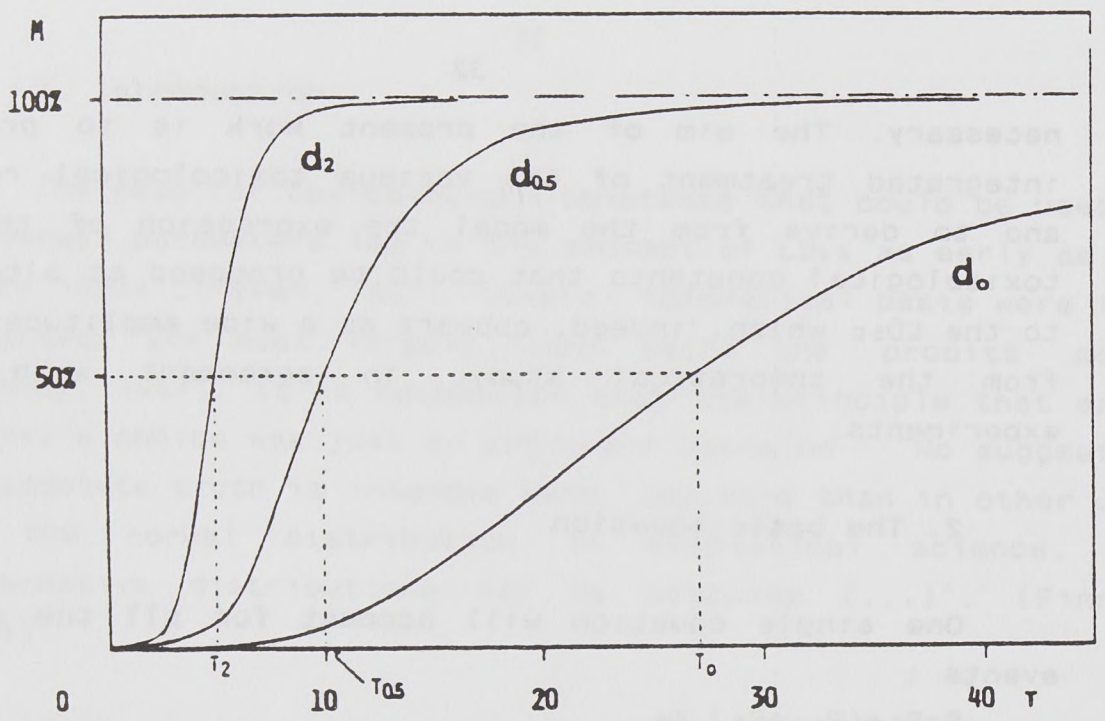


Fig. 1 - Mortalities M % as a function of time (arbitrary units) according to equation (4) with $m_i=0$, at 3 doses. Parameters are : for d_o, $T_o=27$, $n_o=3$; for $d_{0.5}$, $T_{0.5}=10$, $n_{0.5}=4$; for d_2, $T_2=5$, $n_2=6$. Numerical values are simulated from experimental data on honeybees (Hectoux and Bounias, 1988).

2.2 - $(LT_{50})_i$ as a function of doses d_i. Considering that in living beings, parameter To represents a defined reference value, as a characteristic of control population samples (namely : the 'period'), the variable T_i can be expressed as a generally decreasing function of the argument d_i (doses) as follows :

$$T_i=To-(To-\tau)/(1+[\alpha/d_i]^{N_T}) \qquad (5)$$

$T_i=(LT_{50})_i$ is the value observed for d_i ; τ:asymptotic limit of T_i, when $d_i->\infty$; N_T:Hill coefficient of the saturation function $\alpha=dT_{50}$: dose giving the half-effect value of T_i, i.e. $T_i=(To+\tau)/2$. N_T and α are intrinsically constant. It is noteworthy that equation (5) can be written in the remarkable alternative form :

$$(To-\tau)/(T_i-\tau)=1+(d_i/\alpha)^{N_T} \qquad (5')$$

which simplifies to the enzymologic equation of CHOU (1976) when $\tau=0$:

$$(To/T_i)-1=(d_i/\alpha)^{N_T} \qquad (5'')$$

Equation (5) is illustrated by figure 2-A.

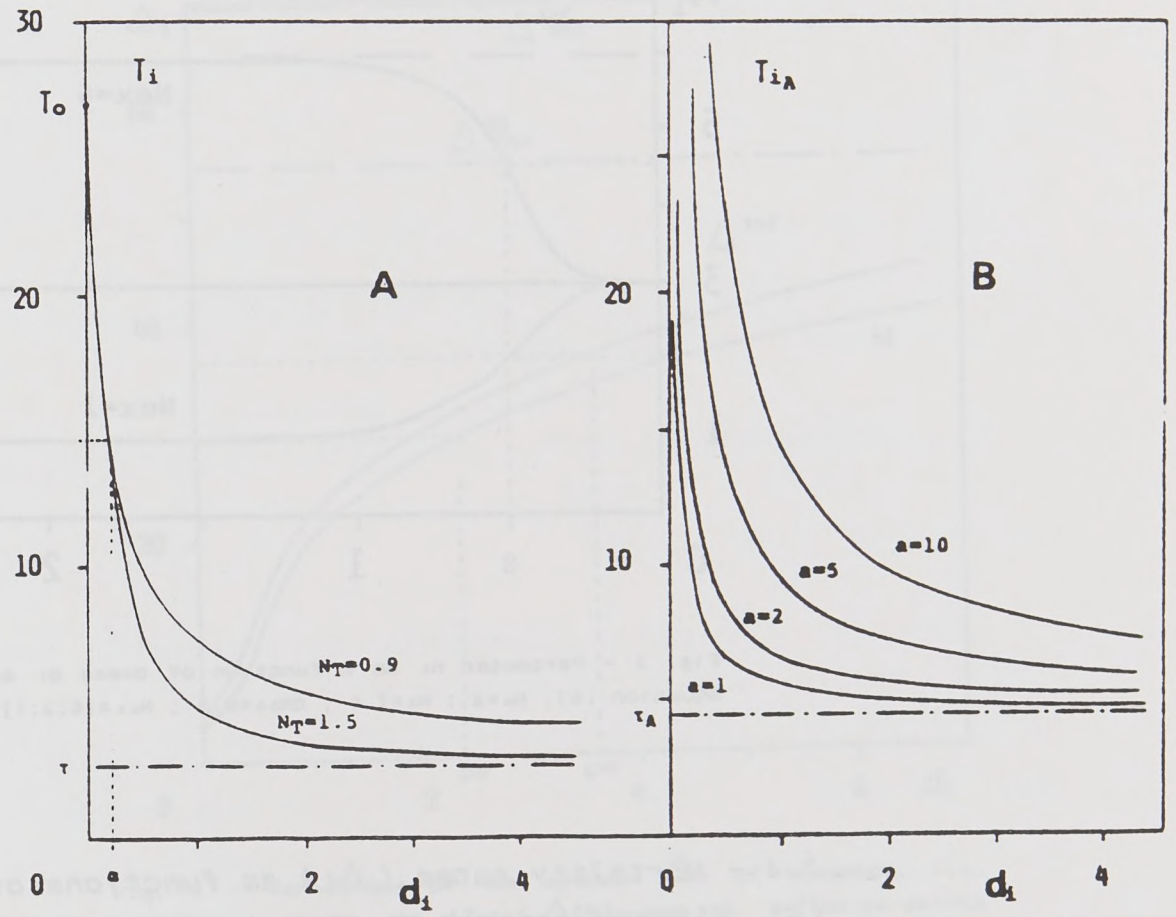


Fig. 2 - Parameter T_i $(TLs_0)_i$ in natural (A) and in Abbott's units (B) as a function of doses d_i, according to equation (5). In (A), 2 values of N_T are considered and in (B) 4 graphs corresponding to 4 values of parameters (a) are given a=(1;2;5;10). Other parameters are : T_o=27 ; N_T=0.9 ; $\alpha=dTs_0$=0.2 ; τ=2.7 ; τ_A=4.5

2.3 - (n_i) as a function of doses (d_i)

The Hill coefficient (n_i) reflects the suddenness of the mortality acceleration. It can thus likely be a function of toxic doses in a number of cases.

$$n_i = n_o + (N_{ex} - n_o)/(1+[\beta/d_i]^{M_n}) \qquad (6)$$

no: initial values for controls ; N_{ex}: extremum value (generally, but perhaps not necessarily always, a maximum) ; N_n : Hill coefficient of the saturation function Φ_n ; $\beta=dN_{50}$: dose eliciting the half maximum variation of n_i, i.e.: $n_i=(n_o+N_{ex})/2$. Equation (6) is illustrated by figure 3.

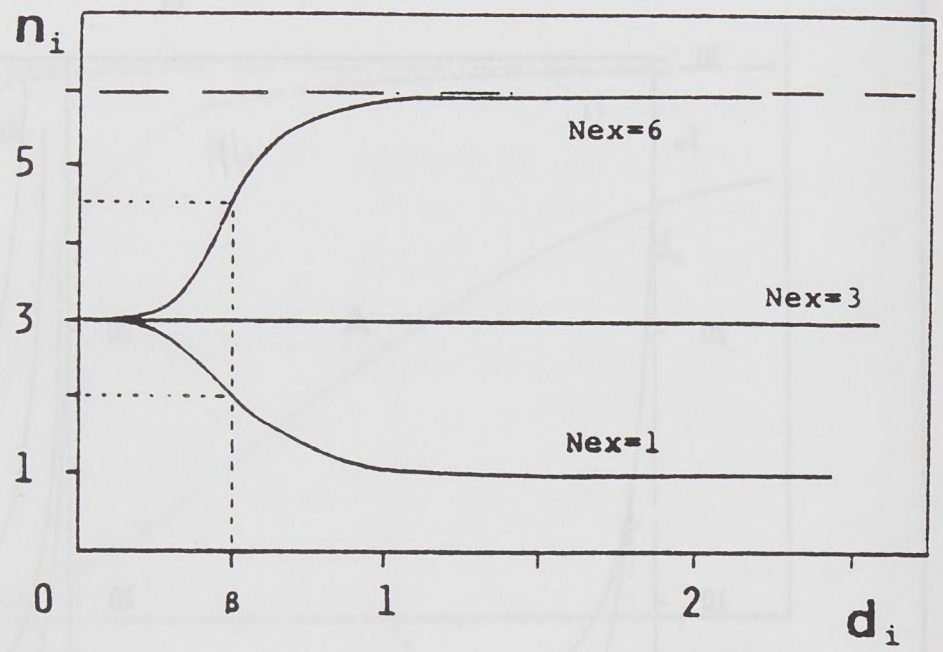


Fig. 3 - Parameter n_i as a function of doses d_i according to equation (6). N_o=3 ; N_n=7.5 ; αN_{oo}=0.5 ; N_{ex}=(6;3;1). $\beta=\alpha N_{oo}$=0.5

2.4 - Mortality rates (Δ_i) as functions of doses (d_i).

Let Δ_i^{50} the tangent at the mortality curve (equation (4)) for M_i=50% at dose d_i. This mortality rate is defined whatever n_i (>1 or <1) by the following relation (Bounias, 1989) :

$$\Delta_i^{50} = 25\ n_i / T_i \qquad (7)$$

Replacing n_i and T_i by their expressions in equations (5) and (6) gives the following relation (illustrated by figure 4)

$$\Delta_i^{50} = 25. \frac{n_o.\alpha^{NT}.\beta^{Nn}+n_o.\beta^{Nn}.d_i^{NT}+N_{ex}.\alpha^{NT}.d_i^{Nn}+N_{ex}.d_i^{(NT+Nn)}}{T_o.\alpha^{NT}.\beta^{Nn}+\tau.\beta^{Nn}.d_i^{NT}+T_o.\alpha^{NT}.d_i^{Nn}+\tau.d_i^{(NT+Nn)}}$$

This equation is representative of an increasing sigmoidal hyperboloid function of d_i, whose limits are :

$\Delta_o^{50}=25.n_o/T_o$ for $d_i \to d_o=0$ (lower limit).

$\Delta_{max}^{50}=25.N_{ex}/\tau$ for $d_i \to \infty$ (upper limit).

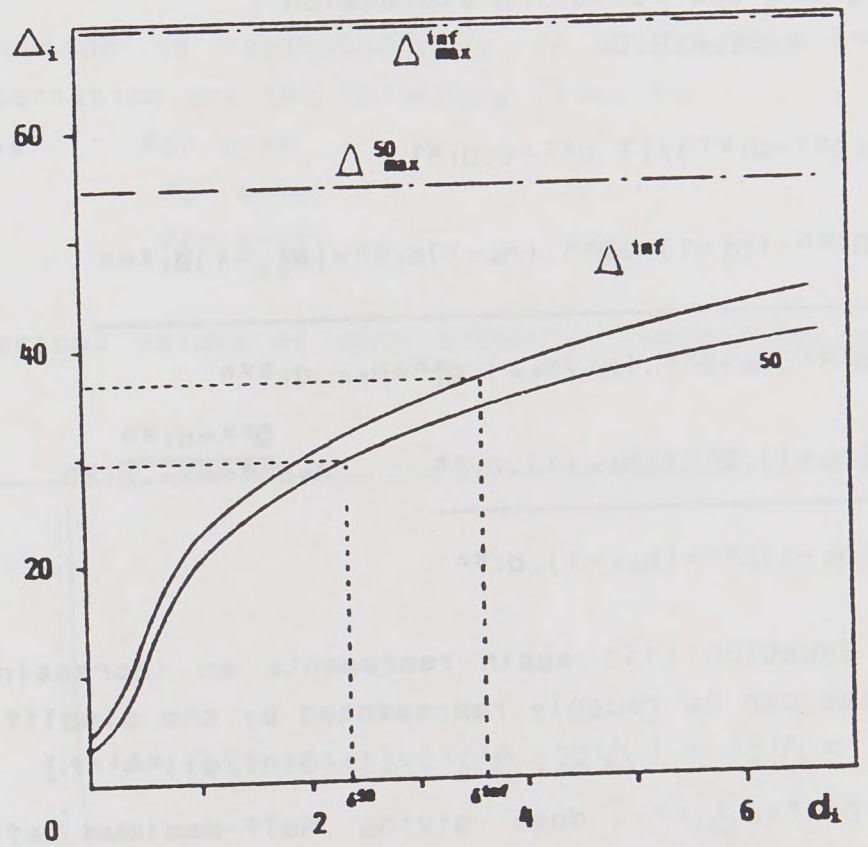


Fig. 4 - Variations of the slopes Δ_i of tangents, i.e. mortality rates, at LTso (Δ_i^{50}) and at inflexion points (Δ_i^{inf}) as functions of doses d_i, according to equations (8) and (11). Parameters as on fig. 2A and 3 ($N_{\Delta i}=6$).

In agreement with Hill (1910), equation (8) can be roughly represented by the simplified form :

$$\Delta_i^{50} = \Delta_o^{50} + (\Delta_{max}^{50} - \Delta_o^{50})/(1+[\delta^{50}/d_i]^{N\Delta 50}) \qquad (9)$$

with $\delta^{50}=d\,\Delta_{50}^{50}$: dose giving half-maximum variation of Δ_i and $N\Delta_{50}$: Hill coefficient of $\Phi^{\Delta 50}$.

Then, in the only case of sigmoid-shaped mortality curves (which is at least the general case for controls and likely for low and moderate toxic doses), the maximum mortality rate can be defined by the slope of the tangent at inflexion point of equation (4'). The numerical value of this slope (^{inf}) is given by the following relation (Bounias, 1989). :

$$\Delta_i^{inf}=25.T_i^{-1}.(n_i-n_i^{-1})[(n_i+1)/(n_i-1)]^{1/n_i} \qquad (10)$$

Replacing T_i and n_i by their values in equations (5) and (6) gives the following expression :

$$\Delta_i^{inf} = 25.A.B.C \qquad (11)$$

with :

$$A = (\alpha^{NT}+d_i^{NT})/(T\,\alpha^{NT}+\tau.d_i^{NT}) \qquad (11')$$

$$B = \frac{\beta^{2Nn}.(n_o^2-1)+2\beta^{Nn}.(n_o-1)d_i^{Nn}+(N_{ox}^2-1)d_i^{2Nn}}{\beta^{2Nn}.n_o+\beta^{Nn}.(N_o+N_{ox}).d_i^{Nn}+N_{ox}.d_i^{2Nn}}$$

$$C = \frac{(n_o+1).\beta^{Nn}+(N_{ox}+1).d_i^{Nn}}{(n_o-1)\beta^{Nn}+(N_{ox}-1).d_i^{Nn}} \qquad \frac{\beta^{Nn}+d_i^{Nn}}{n_o\beta^{Nn}+N_{ox}.d_i^{Nn}}$$

Equation (11) again represents an increasing function of d_i that can be roughly represented by the simplified form :

$$\Delta_i^{inf} = \Delta_o^{inf} + (\Delta_{max}^{inf} - \Delta_o^{inf})/[1+(\delta inf/di)^{N\Delta inf}] \qquad (12)$$

with $\delta^{inf}=d\Delta_i^{inf}$: dose giving half-maximum effect i.e. $\Delta_i^{inf}=(\Delta_{max}^{inf}+\Delta_o^{inf})/2$ and $N\Delta inf$: Hill coefficient.

The limits of Δ_i^{inf} are given by equation (11) :

$$\Delta_o^{inf}=25.T_o^{-1}(n_o-n_o^{-1})\left(\frac{n_o+1}{n_o-1}\right)^{1/n_o} \quad \text{when } d_i \to d_o=0$$

$$\Delta_{max}^{inf}=25.\tau^{-1}(N_{ox}-N_{ox}^{-1})\left(\frac{N_{ox}+1}{N_{ox}-1}\right)^{1/N_{ox}} \quad \text{when } di \to \infty$$

3. Expressions of LD_{50}

The LD_{50} is defined as the dose corresponding to 50% mortality. Two expressions can be derived, according to the fact that we consider 50% of mortality, regardless of controls or relatively to controls mortality, i.e. absolute or relative mortalities.

3.1 - Crude LD_{50} infering from absolute mortalities.

Considering equations (4) and (5) in which $d_i=LD_{50}$ for $M_i=50\%$, the following expression can be directly obtained :

$$LD_{50} = dT_{50}.\left(\frac{T_o-t}{t-\tau}\right)^{1/NT} \qquad (13)$$

This equation is representative of a hyperbolic curve whose characteristics are the following (fig. 5)

$Lim. LD_{50} = -dT_{50}$ for $t \to \infty$

$LD_{50} = 0$ for $t = T_o$

$LD_{50} \to \infty$ for $t \to \tau$

The numerical values of LD_{50} actually range from zero to infinite.

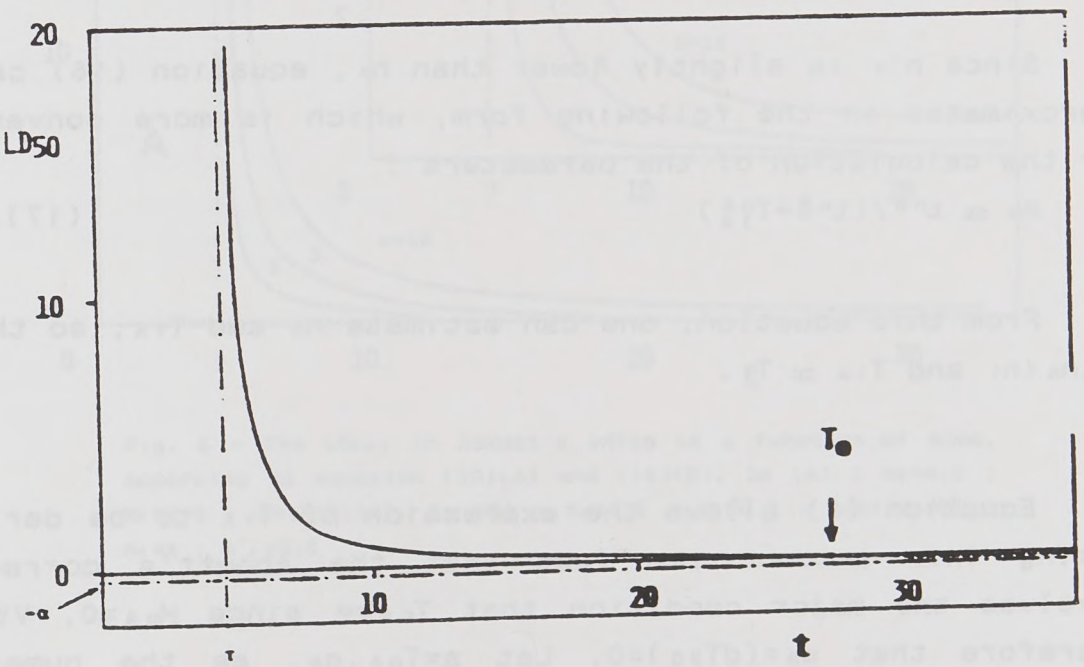


Fig. 5 - The LD_{50} in natural units as a function of time, according to equation (13). $dT_{50}=0.2$; $T_o=27$. $\tau=4.5$; $M_T=0.9$. The curve actually intercepts the horizontal axis at T_o.

3.2 - LD_{50} in Abbott's coordinates. The occurence of significant mortalities versus time is to be expected in control samples. One may therefore wish to correct the observed absolute mortalities M_i observed with doses d_i, taking into account the corresponding mortalities M_o observed in controls at each time, according to the following relation (Abbott, 1925)

$$M_{i\,A} = 100\ (M_i - M_o)/(100 - M_o) \qquad (14)$$

Replacing M_i and M_o by their expression in equation (4) allows the following expression of Abbott's corrected mortalities to be deduced

$$M_{iA}=100\ t^{n'_i}\ [1-(t/T_o)^{n_o}\ (T_i/t)^{n'_i}]/(t^{n'_i}+T_i^{n'_i}) \qquad (15)$$

Let $m_A=M_{iA}/100$, for simplification equation (15) can be replotted in the following form

$$m_A=t^{n'_i}/(t^{n'_i}+T_i^{n'_i}) \qquad (16)$$

in which $n'_i=n_i+Ln[1-(t/T_o)^{n_o}.(T_i/t)^{n'_i}]/Ln\,t$

Since n'_i is slightly lower than n_i, equation (16) can be approximated in the following form, which is more convenient for the calculation of the parameters :

$$m_A \simeq t^{n_A}/(t^{n_A}+T_{iA}^{n_A}) \qquad (17)$$

From this equation, one can estimate n_A and T_{iA}, so that : $n_o \leq n_A < n_i$ and $T_{iA} \simeq T_i$.

Equation (5) allows the expression of T_{iA} to be derived, taking into account the fact that the Abbott's correction involves the major condition that $T_{oA}=\infty$ since $M_{oA}=0$, Vt and therefore that $a_A=(dT_{50})=0$. Let $a=T_{oA}.a_A$, as the numerical value of the undeterminated form $(0.\infty)$ of this expression : then it immediately comes :

$$T_{iA}=(LT_{50})_{iA}=\tau_A+a/d_i^{NT} \qquad (18)$$

This is the new expression of the variations of time at which 50% of subjects are dead, relatively to controls (fig. 2B). Of course, this relation is meaningless than equation (5) since there is no value of dT50 to be infered, and parameter T_i should therefore not be plotted in Abbott's units

Using equation (18) in equation (17) and assuming that $m_A=1/2$ when $d_i=LD_{50A}$, however gives the following interesting value

$$LD_{50A}=[a/([2t^{n'_i}-t^{n'_i}]^{1/n'_i}-\tau_A)]^{1/NT} \qquad (19)$$

In this case $LD_{50A} \to 0$ when $t \to \infty$ and $LD_{50A} \to \tau A$ when $t \to 0$. Using the approximate exponent n_A (which can be actually determined with accuracy) in place of n_i and n'_i gives the simplified form:

$$LD_{50A} \simeq [a/(t-\tau_A)]^{1/NT} \qquad (20)$$

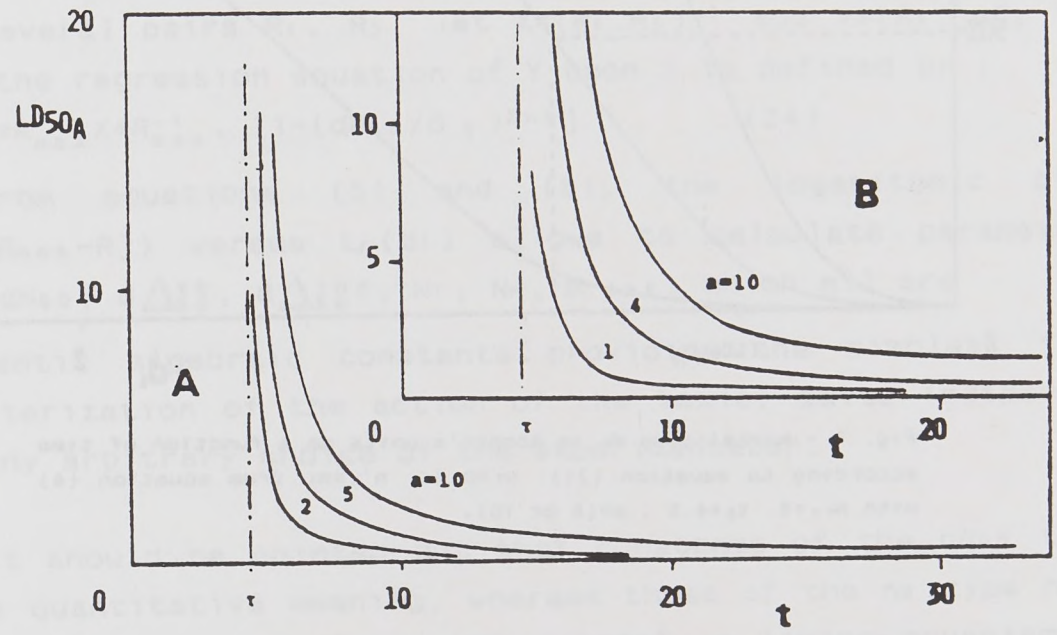


Fig. 6 - The LD_{50A} in Abbott's units as a function of time, according to equation (20)(A) and (19)(B). In (A) : τ_A=4.5 ; $N\tau$=0.9 ; a=(2;5;10). In (B) : τ_A=4.5 ; $N\tau$=0.9 ; a=(1;4;10) ; n_i=4 ; n'_i=3.8

These expressions are illustrated by figure 6(A and B). Because of the practical differences between n_i and n'_i, and (although to a lesser extent) between T_i and T_{iA}, it may be that τ_A slightly differ from τ.

4. Dose/mortality plot in Abbott's units.

The usual practice is to plot dose/mortality curves at a chosen value of time t, using Abbott's corrected values of mortalities. The expression of mA infers from equations (16) and (18) (fig. 7) :

$$m_A = t^{n'_i} . d_i^{(n_i+NT)} / [(a+\tau_A . d_i^{NT})^{n_i} + t^{n_i} . d_i^{(n_i+NT)}] \qquad (21)$$

41

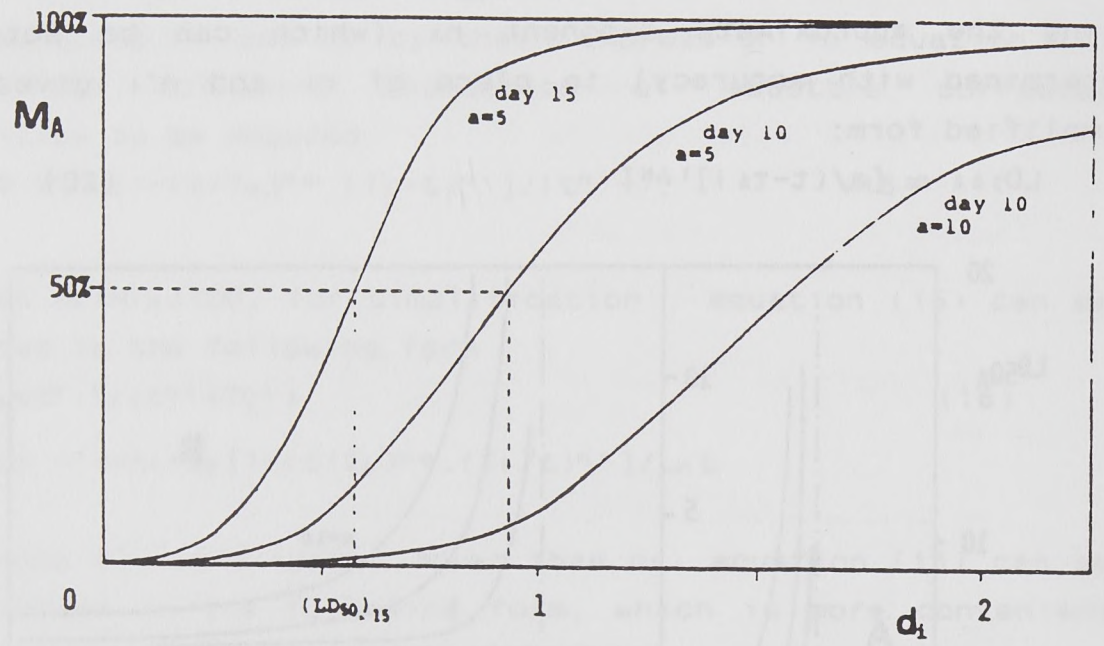


Fig. 7 - Mortalities M_A in Abbott's units as a function of time according to equation (21). N_T=0.9 ; $n'_i=n_i$ from equation (6) with N_{ox}=6. τ_A=4.5 ; a=(5 or 10).

Equation (21) develops into the following form :

$$m_A=d_i(n_i+N_T)/[a^{n_i}/t^{n'_i}+\ldots+(t^{n_i}/t^{n'_i}+\tau_A/t^{n'_i}).d_i(n_i+N_T)] \quad (21')$$

which clearly shows that the asymptotic limit of m_A, when $d_i \to \infty$ is lower than 1, so that :

$$Lim.M_{iA}(d_i\to\infty)=100/[t^{lim(n_i-n'_i)}+\tau_A{}^{lim.n_i}/t^{lim\ n'_i}] \quad (22)$$

that is, since $lim.(n_i, n'_i)=N_{ox}$:

$$Lim.M_{iA}(d_i\to\infty)=100/[1+(\tau_A/t)^{N_{ox}}] \quad (22')$$

This means that in the widely used Abbott's corrected units, the maximum mortality should, therefore, never reach 100%. When t strongly deviates from τ_A by lower values ($t<<\tau_A$), then $M_{iAmax}<<100\%$.

5. Discussion and conclusions

The mortality % appears as a fuction of time and also of 2 functions of doses, namely $T_i(d_i)$ and $n_i(d_i)$, i.e.

$$M_i=100.\Phi_M(t, T_i, n_i) \quad (23)$$

Then, (T_i-T_o) and (n_i-n_o) are, in turn, respectively characterized by $\Phi_T(d_i)$ and $\Phi_N(d_i)$. The asymptotic limits in these last 2 cases, as well as in $M_{Amax}(d_i)$ at fixed t, are not

known. However, they can be easily calculated using the following theorem (Bounias, 1989) :

Let $R_i=(T_i-T_o)$, (n_i-n_o), Δ^{50} or Δ^{inf}, etc., obtained at d_i, and R_j obtained at d_j, so that $d_i.d_j=d^2$, a fixed value. From several pairs R_i, R_j, let $X=(R_i.R_j)^{-1}$ and $Y=(R_i^{-1}+R_j^{-1})$. Then, the regression equation of Y upon X is defined by :

$$Y=R_{max}X+R_{max}^{-1}.\ [1-(dR_{50}/d\gamma)^{2n_R}] \qquad (24)$$

From equations (5) and (6), the logarithmic plot $Ln(R/[R_{max}-R])$ versus $Ln(d_i)$ allows to calculate parameters dT_{50}, dN_{50}, $d\Delta^{50}_{50}$, $d\Delta^{inf}_{50}$, N_T, N_n, N_{inf}, which all are

authentic algebraic constants providing the simplest full characterization of the action of the toxic, quite indepently from any arbitrary choice of the experimentator.

It should be pointed out that constants of the dR_{50} type have a quantitative meaning, whereas those of the n_R type have a qualitative one. Following this model, a living organism is considered as the sum of ν_r receptors interacting with ν_L ligands, which are involved in the toxic process. The Hill coefficients may represent estimations of the $\nu_L/\ \nu_r$ ratios (Bounias, 1983).

On can assume that a decreasing function of n_i versus doses could be the sign of a low toxicity characteristic, if not a stimulatory action.

Of course, coefficients n_i, for instance, may look unusual to a number of toxicologists, whereas the LT_{50}, (instead of LT_{50}) has already been taken in consideration by Haverty and Dell (1984) using an empirical method. But nobody has looked at the existence of the dT_{50} parameter as a constant.

On the other hand, plotting LTx versus doses gives a decreasing function, by contrast with the usual increasing dose/mortality curve, at a fixed time. It thus seemed interesting to propose another toxicological parameter exhibiting an ascending function of doses. This is the case for

Δ^{50} and Δ^{inf}, which are not subject to any arbitrary choice of time and respectively represent two values of the mortality rates : the first one represents a readily available algebraic being, and the second is the maximum value, existing in cases where $n_i > 1$. These parameters, in turn, allow the simple calculation of four authentic constants :

$d\Delta^{50}_{50}$, $d\Delta^{inf}_{50}$, N_{50} and N_{inf} which can be estimated as abovely explained. Although these values could theoretically infer from the plots of Φ_M, Φ_T and Φ_n, they might be considered as an interesting alternative to the unsatisfactory dose/mortality plot which needs an arbitrary choice of time.

This drives our attention to the very large variations that can be expected in the determination of LD_{50} values. At a chosen time t, not strongly higher than τ or τ_A, very large amplitude variations may occur, which can explain that, for instance, the same pesticides assayed on honeybees by two distinct teams, may exhibit LD_{50} values in a range over 1 to 900 µg per bee (Associate committy on scientific criteria for environmental quality, 1981). It should be noted that for $t=(LT_{50})_o$, 50% mortality is actually observed at $d_o=0$, so that $LD_{50}=0$, which is actually predicted by equation (13).

Lastly, equations (21) and (22) confirm, by the theoretical approach, the interest of also using the Hill equation even in dose/mortality relationships at fixed times since the unknown asymptotic maximum mortality ($M_{IA-max}<100\%$) can be calculated by a quite robust method : this was clearly evidenced in a replot of original data of Finney by Bounias (1989).

All the presented results show in very close agreement with the mortality data obtained after chronic administration of cupric sulphate to honeybees per os (Nectoux and Bounias, 1988) and of course, one can expect that a large range of various cases will be found in the future. In the case of acute toxic administration, it should be recommended that toxics are administered far before the time at which the mortality rate starts increasing in a significant way, i.e. roughly at a time

$t<t_{i\,lim} = t_i.[(n_i-1)/(n_i+1)]^{(n+1)/n}$ which is the horizontal intercept of the tangent at inflexion point of the time/mortality curve. Then, the shape of the whole curve should be recorded and treated as suggested in this paper

Accordingly, no great theoretical differences are to be expected between acute and chronic toxicology and the common feature of all types of study is that mortalities should in all cases be monitored during the whole lifespan of the subjects. This might be, despite the difficulties that might arise in the case of long lifespan animals (including men), the major condition that would allow a more rigorous new toxicology to start.

Professors Jean ROCHE and Henri PACHECO are greatly acknowledged for their kind encouragements and advices. Thanks are due to MRS. N. BARESTE for expert help in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

ABBOTT, W.S. (1925). J. Econ. Ent. 18, 265-267.

ASSOCIATE COMMITTEE ON SCIENTIFIC CRITERIA FOR ENVIRONMENTAL QUALITY (1981). Pesticide Pollinator Interactions, Ed. N.R.C., Canada.

BOUNIAS, M. (1983). C.R. Acad. Sci. (Paris), 297III, 583-588.

BOUNIAS, M. (1989). Fundam. Clin. Pharmacol., 3, 1-9.

CHANTER, D.O. & HEYWOOD, R. (1982). Toxicol. Lett., 10, 303-307.

CHOU, T.C. (1976). J. Theor. Biol., 59, 263-276.

CHRISTENSEN, E.K. & NYHOLM, N. (1984). Environ. Sci. & Technol., 18, 713-718.

FINNEY, D.J. (1947). Probit analysis : A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve, London, Cambridge University Press.

FINNEY, D.J. (1950). Sankhya, 10, 341-360.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C. & THURSTON, R.V. (1977). Environ. Sci. & Technol., 11, 714-719.

HAVERTY, M.I. & DELL, T.R. (1984). Pestic. Sci., 15, 369-374.

HILL, A.V. (1910). J. Physiol., 40, 1-4.

LITCHFIELD, J.T. & WILCOXON, F. (1949). J. Pharmacol. Theor., 96, 99-113.

MEHLMANN, M., SHAPIRO, R.E. & BLUMENTHAL, H. (1976). New Concepts of Safety Evaluation, London, N.Y. : John Wiley & Sons.

MILLER, L.C. & TAINTER, M.L. (1944). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57, 261-264.

NECTOUX, M. & BOUNIAS, M. (1988). C.R. Soc. Biol., 182, 545-556.

TREVAN, J.W. (1927). Proc. Roy. Soc., 101B, 483-514.

VALETTE, C. (1972). Précis de Pharmacodynamie, Masson Ed., Paris.ZBINDEN, G. & FLURY-ROVERSI, M. (1981). Arch. Toxicol., 47, 77-99.

VIII - Toxicologie appliquée -

1- Action de la toxine du Bti chez le moustique

Collaboration avec l'Univ. de Montpellier (Dr. C.P. Vivarès)

Ce travail constitue la suite des publications consécutives à la soutenance de thèse de M. B. Nizeyimana, après que les données obtenues au laboratoire de Biochimie aient été réexaminées et interprétées de manière plus approfondie -

Les données de bases ont ainsi été, en majorité, publiées - Les travaux suivants portent sur la mise en évidence de l'existence de relations biochimiques fonctionnelles et des variations de leurs paramètres sous l'action de doses croissantes de toxine.

Trois titres ont paru en 1989 :

C.R. Soc. Biol., 183, 67-71

Pestic. Biochem. Physiol., 34, 86-91

J. Invert. Pathol., 54, 16-22

Toxicologie comparée.

C. R. Soc. Biol., 1989, *183*, 67-71.

Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves d'*Aedes aegypti* (Insecte, Diptère), par la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*.

IV. Acides aminés : lysine, histidine, cystéine et acide glutamique.

par Christian P. Vivares *, Michel Bounias **
et Bonaventure Nizeyimana **

* *Laboratoire de Pathologie comparée*
(URA CNRS-INRA n° 11840),
Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
34060 Montpellier Cedex.

** *Laboratoire de Biochimie,*
INRA-Avignon, B. P. 91, 84140 Montfavet, France

(reçue le 7 mars 1989).

Summary. — Rearing 4th instar larvae of *Aedes aegypti* on 4 concentrations of *Bacillus thuringiensis israelensis* endotoxin i. e. 0.01, 0.02, 0.10, 1.00 mg.l^{-1}, elicits an increase of half-cystine haemolymph levels at 0.01 mg.l^{-1} and a decrease at higher doses. Lysine and histidine are only significantly increased at the higher doses. The results are not modified in larvae exhibiting agony symptoms; this is also the case for glutamic acid, which does not show any reliable variation. The observed symptoms thus express a toxicity apparently not directly linked to the lethal action of the toxin.

Résumé. — L'administration aux larves du 4e stade d'*Aedes aegypti* de 4 concentrations de la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*, soit 0,01, 0,02, 0,1, 1,0 mg.l^{-1}, entraîne une augmentation de la cystéinémie à 0,01 mg.l^{-1} suivie d'une diminution aux doses plus élevées. La lysine et l'histidine augmentent seulement aux plus fortes doses.

Les résultats ne sont pas fondamentalement modifiés chez les larves présentant les symptômes de l'agonie, de même que dans le cas de l'acide glutamique pour lequel aucune variation n'est observée. Les symptômes observés expriment donc des manifestations de toxicité apparemment non directement reliées à la létalité provoquée par la toxine.

143

Depuis sa découverte, voici une dizaine d'années (1), la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis* apparaît comme un important moyen de lutte antivectorielle vis-à-vis des moustiques (2). Les effets létaux de la toxine sont patents, mais les mécanismes par lesquels elle agit sur le métabolisme du Diptère-cible n'ont pas été identifiés. Le but de nos recherches consiste à déceler les modifications de certains paramètres biochimiques sous l'action de doses croissantes de toxine, et de comparer les réponses obtenues, d'une part chez les larves d'aspect normal et, d'autre part, chez celles présentant des symptômes caractéristiques de l'état d'agonie.

Dans un précédent travail (3), nous avons montré que, parmi les amino-acides polaires présents en quantités significatives dans l'hémolymphe des larves du 4e stade d'*Aedes aegypti*, ceux qui sont considérés comme susceptibles d'être impliqués dans l'osmorégulation, soit l'asparagine, l'alanine, l'arginine, le glycocolle, la proline et la sérine, ont en commun la propriété d'être diminués sous l'action de faibles concentrations de la toxine et augmentés sous l'action de doses élevées. Ces manifestations constituent une expression de la toxicité dont il serait intéressant de discerner quels aspects peuvent être liés à la létalité : or, dans le cas des larves présentant les symptômes de l'agonie, cette réponse biphasique en fonction des doses ne disparaît que dans le cas de l'asparagine et du glycocolle. Il paraissait donc qu'il y avait lieu d'examiner les réponses des autres amino-acides polaires présents dans l'hémolymphe, le cas des amino-acides apolaires faisant l'objet de recherches en cours.

Matériel et méthodes. — Les larves d'*Aedes aegypti* ont été élevées comme précédemment décrit (4) puis, à partir du 4e stade, maintenues par lots de 25 individus en récipients de 200 ml contenant 199 ml d'eau et 1 ml de suspension de toxine ajustée de manière à réaliser les concentrations finales suivantes : 0,00 (témoins); 0,01; 0,02; 0,10; 1,00 mg.l^{-1} d'une préparation titrant 12 000 u. i. par milligramme. Les prélèvements d'hémolymphe sont effectués comme précédemment (3) et les amino-acides séparés et dosés selon des méthodes chromatographiques décrites ailleurs (5). Les larves considérées comme ne présentant aucun symptôme visible d'intoxication (aspect normal) sont douées d'une mobilité spontanée et d'une réaction au toucher par une aiguille inoxydable identiques à celles des témoins. Les signes caractéristiques de l'état d'agonie sont l'inertie totale, associée à une très faible réaction résiduelle abdominale à l'excitation par une aiguille.

Les probabilités associées aux comparaisons de moyennes et à la signification des coefficients de corrélation ont été calculées d'après l'équation de distribution de « t » de Student. Les pentes de régression ont été calculées par la méthode des moindres carrés ou des moindres rectangles, selon que les variables de référence sont aléatoire et contrôlée ou toutes deux aléatoires.

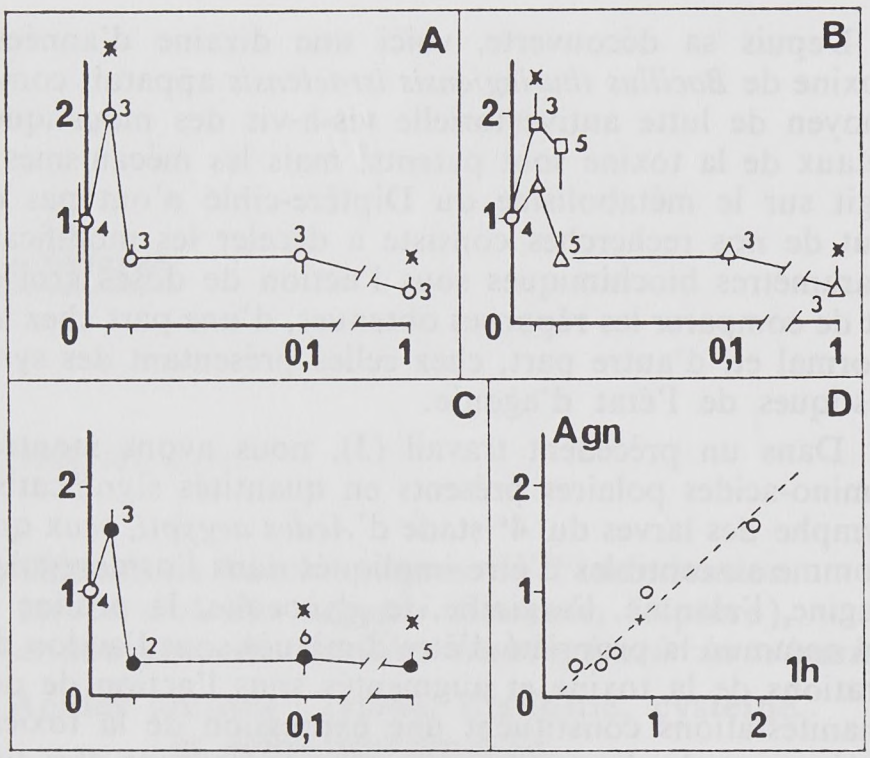


FIG. 1. — Réponse de la cystéinémie (en unités relatives) à l'action de doses croissantes de toxine (mg.l^{-1}). A = après 1 h; B = après 2 h (—Δ—) et 36 h (—□—); C = à l'agonie. Les nombres de mesures sont précisés et les écarts types figurés sur chaque point. Les astériques marquent les déviations significatives. D = corrélation entre les réponses à 1 h et à l'agonie (Agn).

Résultats. — Les variations significatives observées dans le cas de la cystéinémie sont illustrées par la figure 1. Les concentrations sont augmentées à la plus faible dose et diminuées aux doses élevées, aussi bien chez les larves d'aspect normal (Fig. 1, A et B) que celles présentant les symptômes de l'agonie (Fig. 1, C). Une corrélation fortement significative est observée entre les données obtenues après 1 h de traitement et à l'agonie : $\rho = +0{,}962$ ($N = 5$; $P = 0{,}01$; $d = 0{,}875 \pm 0{,}15$) (Fig. 1, D).

Le tableau I montre que la lysinémie et l'histidinémie augmentent sous l'action des doses élevées après 1 à 6 heures de traitement, ainsi qu'à l'agonie dans des proportions comparables à celles observées chez les larves d'aspect normal. La dose 0,02 mg.l^{-1} provoque, en revanche, une diminution de la lysinémie significative à partir de la 12e heure et maximale à l'agonie.

Au bout de 2 heures, les relations doses/effets exprimées en unités naturelles s'expriment par une forte corrélation linéaire positive de coefficients et de pentes de régressions respectifs :

Lysine : $\rho = 0{,}984$ ($P < 0{,}005$); $b = 2{,}37$ ($\sigma = 0{,}25$).
Histidine : $\rho = 0{,}967$ ($P < 0{,}001$); $b = 2{,}78$ ($\sigma = 0{,}42$).

Le tableau II indique les résultats obtenus avec l'acide glutamique :

TABLEAU I. — Réponse de la lysinémie et de l'histidinémie à l'action de la toxine.

Temps (h)	Doses (mg.mg.l^{-1}) 0,01	0,02	0,10	1,00
[Lysine : témoins $\bar{x} = 1,0$ (N = 5) $\sigma = 0,4$]				
1	1,1 (3) 0,1	1,1 (3) 0,1	0,7 (3) 0,1	1,3 (3) 0,4
2	1,5 (3) 0,2	1,2 (3) 0,1	1,6 (3) 0,4	3,6 (3) 1,7 (a)
6	1 5 (3) 0,1	0,8 (3) 0,1	2,8 (3) 0,3 (a)	—
12	1,1 (3) 0,1	0,4 (3) 0,1 (c)	—	—
24	1,2 (3) 0,1	0,4 (3) 0,1 (c)	—	—
36	0,9 (3) 0,1	0,4 (3) 0,1 (c)	—	—
Agonie	0,6 (3) 0,2	0,3 (3) 0,1 (d)	3,6 (3) 0,5 (a)	3,5 (3) 0,6 (a)
[Histidine : témoins $\bar{x} = 1,0$ (N = 4) $\sigma = 0,3$]				
1	0,9 (3) 0,2	1,0 (3) 0,1	1,3 (3) 0,3	2,9 (3) 0,1 (b)
2	0,9 (3) 0,3	0,9 (5) 0,3	1,9 (3) 0,3	3,8 (3) 1,0 (b)
6	1,3 (3) 0,4	0,7 (5) 0,3	2,0 (4) 0,5 (b)	—
Agonie	0,9 (3) 0,1	0,9 (2) 0,1	1,8 (6) 0,3 (b)	2,5 (7) 0,5 (a)

Les résultats sont exprimés en unités relatives, rapportées aux témoins des mêmes séries et des mêmes durées avant prélèvements. Les moyennes (x) et les écarts types (σ) sont calculés d'après (N) mesures.

Augmentation significative : $P \leqslant 0,01$ (a) ou $P \leqslant 0,05$ (b).

Diminution significative : $P < 0,05$ (c) et $P < 0,02$ (d).

TABLEAU II. — Action de la toxine du *Bacillus thuringiensis israelensis* sur les concentrations en acide glutamique + glutamine dans l'hémolymphe de larves du 4e stade d'*Aedes aegypti*.

Temps (h)	Concentrations de la toxine en mg.l^{-1} 0,01 $\bar{x}$ (N) σ	0,02 $\bar{x}$ (N) σ	0,10 $\bar{x}$ (N) σ	1,00 $\bar{x}$ (N) σ
0,5	1,0 (5) 0,2	1,0 (5) 0,1	0,9 (4) 0,15	0,9 (4) 0,3
1	1,1 (5) 0,2	1,0 (5) 0,1	1,1 (4) 0,2	1,0 (2) 0,1
2	1,3 (5) 0,1	1,1 (5) 0,1	1,3 (4) 0,1	1,6 (4) 0,5 (b)
6	1,4 (5) 0,1	0,9 (5) 0,1	0,9 (4) 0,1	—
12	1,4 (7) 0,2	0,8 (4) 0,1	—	—
24	1,1 (5) 0,2	0,9 (5) 0,1	—	—
36	1,7 (5) 0,4 (a)	1,3 (5) 0,2	—	—
Agonie	0,9 (3) 0,1 36 h	0,7 (2) 0,1 36 h	1,0 (5) 0,3 8 h	1,2 (3) 0,3 6 h

Les valeurs moyennes ($\bar{x}$) et les écarts types (σ) ont été calculés à partir de (N) déterminations et exprimés en unités relatives, par rapport aux témoins correspondant à chaque dose et à chaque durée, soit : $\bar{x} = 1,0$ (N = 4) = 0,20.

Augmentation significative à $P = 0,04$ (a) et $P = 0,07$ (b).

les faibles augmentations observées ne sont significatives qu'avec la plus faible dose au bout de 36 h ; aucune variation n'est observée à l'agonie.

Discussion et conclusions. — L'acide glutamique est impliqué dans un grand nombre de réactions, en particulier du fait de son rôle dans la transamination. Nos résultats montrent que, quelles que soient les conditions d'intoxication des larves, à une exception près, aucun effet significatif n'est observé à son niveau, contrairement à ce qui se produit chez un autre moustique, *Anopheles*, infecté par le sporozoaire *Plasmodium berghei*, où la concentration de l'acide glutamique augmente en même temps que celle de la lysine (6). Toutefois, il convient de souligner, à ce propos, que l'action d'une toxine administrée à l'état pur ne peut légitimement être comparée à celle d'un parasite qui effectue, aux dépens de son hôte, des prélèvements de nutriments. Chez les larves d'aspect normal, les variations de la lysinémie et celles de l'histidémie ne rappellent les augmentations observées pour d'autres amino-acides polaires qu'aux plus fortes doses. Seule la cystéine présente des relations doses/effets de type biphasique, mais dans un sens opposé à celles précédemment observées (3).

L'état d'agonie laisse inchangée la réponse de ces trois amino-acides, à l'exception d'une diminution de la lysinémie à la dose 0,02 $mg.l^{-1}$. Dans ce dernier cas, où la létalité ne peut être associée à un sens caractéristique de variation, comme dans les premiers cas où ses effets ne se démarquent pas de ceux se manifestant sur des larves faiblement atteintes, il apparaît que les variations observées traduisent des symptômes de toxicité non directement reliés à un facteur de létalité.

Bibliographie

1. Goldberg L. J. & Margalit J., *Mosq. News*, 1977, *37*, 355-358.
2. Roberts D. W., Daoust R. A. & Wraight S. P., Bibliography of medically important Arthropods, WHO/VBC Rep., 1981, 83.1.
3. Vivares C. P., Bounias M. & Nizeyimana B., *C. R. Soc. Biol.*, 1988, *181*, 666-676.
4. Nizeyimana B., 1985, Thèse de 3e cycle, Montpellier, 329 p.
5. Bounias M. & Bounias A., *Analusis*, 1980, *8*, 287-295.
6. Gad A. M., Meier W. A. & Piekarsky G., *Z. Parasitenk.*, 1979, *60*, 263-276.
7. Mack S. R. & Samuels S., *J. Parasitol.*, 1979, *65*, 317-321.

147

PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY 34, 86–91 (1989)

Alteration of the Lipid/Carbohydrate Functional Relationship in *Aedes aegypti* Submitted to the δ-Endotoxin of *Bacillus thuringienis israelensis*

C. P. VIVARES,* M. BOUNIAS,† AND B. NIZEYIMANA†

*USTL, Laboratoire de Pathologie Comparée, UA INRA-CNRS n° 1184 Place Eugene-Bataillon, F34060 Montpellier Cédex, France; and †Laboratoire de Biochimie, INRA-Avignon Domaine St-Paul, BP 91, F84140 Montfavet, France

Received May 25, 1988; accepted March 30, 1989

In healthy fourth instar larvae of *Aedes aegypti*, the concentrations of total lipids versus total carbohydrates and, more specifically, those of fatty acids versus glucose and phospholipids versus trehalose are significantly linked by negative correlations which are indicative of their metabolic interconversion. The regression slopes of these correlations are modified by the intoxication process, and this phenomenon is quantitatively dose related in the case of fatty acids versus glucose and phospholipids versus trehalose relationships. The near-death symptoms generally do not fit the observed correlations, from which they more strongly deviate in the case of phospholipids versus trehalose correlations. © 1989 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

The δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) is considered by the WHO as one of the most potential means of action against mosquitoes (1). Among these, *Aedes aegypti* is a vector of the viruses of the dengue and yellow fever diseases: it introduces problems in tropical countries, and is also present in southern parts of Europe, around the Mediterranean sea. Previous publications have reported some significant alterations in carbohydrate (2) and lipid (3) concentrations in fourth instar larvae kept for 36 h in water containing various doses of *Bti* toxin. It is noteworthy, however, that biochemical responses to various stresses can be magnified or even specifically shown using the relationships between compounds linked by metabolic interactions (4, 5). Considering a correlation of biochemical parameters rather than one-dimensional systems offers several advantages. The first advantage provides information on the metabolic pathway involved in the correlation, even when time-course variations cannot be interpreted. The second advantage is that this method offers additional information on quantitative comparisons: in effect, it may occur that a numerical parameter is situated within the range of normal variations (as observed in controls) but not belong to the relation. Reciprocally, a value can be located out of the range of normal deviations, but still on the prolongation of the curve representative of the normal relation. Finally, when such relations do exist, their algebraic description provides objective parameters which can be, in turn, plotted versus toxicologic factors, such as doses (6), and provide dose/effect relationships in cases where none could appear from the usual plots.

In the described experiments, no simple relations could be inferred from the time-course variations of the studied parameters. The observed oscillations were not interpretable even in terms of chronobiology, and the comparisons of concentrations, relative to controls, at each time following the beginning of treatments did not provide any characteristic features. In contrast, consideration of quantitative relationships between lipids and carbohydrates revealed a

† To whom correspondence should be sent.

0048-3575/89 $3.00
Copyright © 1989 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

number of striking results, which are reported in this paper.

MATERIALS AND METHODS

The hatching of the eggs of *A. aegypti* in 25°C water oxygenated by an air-pulsing system was initiated by the addition of 80 mg · liter^{-1} of ascorbic acid, which elicits anoxia stress. At the beginning of the second instar, larvae were transferred in jars, kept at 28 ± 1°C and containing water to which was added, every 48 hr 1 mg of dog food (20.5% proteins, 7.5% lipids, 7% minerals, 3.5% cellulose, 4% free carbohydrates, vitamins A, D3, E supplemented). When larvae reached the fourth instar, they were gathered by 25 in jars with 200 ml water or 199 ml water and 1 ml of a 12,000 UI · mg^{-1} toxin suspension; the final toxin concentrations were O (control), 0.01, 0.02, 0.10, and 1.00 mg · liter^{-1}. After a 30-min to 36-hr incubation period, larvae were trapped by 20 individuals samples. Hemolymph was obtained from the punctured abdominal siphon (a pooled sample of 4 to 8 µl vol was obtained for carbohydrate determinations). The abdomens were then excised, weighed, and ground in Potter homogenizers with a chloroform:methanol (80:20, v/v) mixture. After a 15-min centrifugation at 5000*g*, the chloroform phase was collected and concentrated under low pressure to a volume of 2 µl/mg fresh wt and was then ready for lipid determinations. Carbohydrates and lipids were then quantitatively determined using previously described chromatographic methods (7).

Criteria for near-death symptoms were complete loss of spontaneous motility and very weak abdomen movement in response to excitation with a stainless steel point, in contrast with normal behavior.

The significance (P) of the correlation coefficients (ρ) was determined using the equation of Student's t distribution. The regression coefficients were calculated using the least-squares or the least-rectangle method according to whether one variable is considered as the reference (b) or not (d). The variance of these slopes was estimated by

$$\sigma^2_b = [(b/\rho)^2 - b^2]/\nu$$

or

$$\sigma^2_d = (1 - \rho^2) \cdot d^2/\nu$$

with $\rho = N - 2$, N = number of pairs of data, from independent determinations.

Slopes were compared two by two, i.e., b_i and b_j or d_i and d_j, using the t test from the same expressions: $t = |b_i - b_j|/(\sigma_{bi} + \sigma_{bj})$, which also holds for d_i and d_j. The levels of risks are designated by P for a freedom degree $\upsilon = N_i + N_j - 2$.

RESULTS

1. *Basic Functional Relationships in Healthy Larvae*

In fourth instar larvae kept under normal conditions (free of toxin), there was a general correlation between total lipids and to-

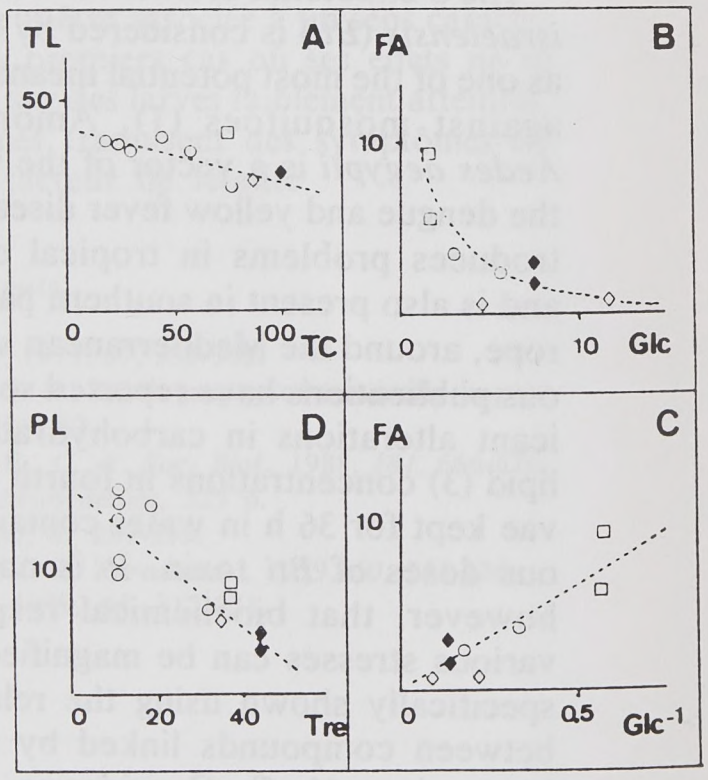


FIG. 1. *Correlations between the concentrations of total lipids (TL) and total carbohydrates (TC) (A), fatty acids (FA), and glucose (Glc) (B) or (glucose)*$^{-1}$ *(C) and phospholipids (PL) and trehalose (Tre) (D) in healthy larvae of A. aegypti. Hemolymph carbohydrates contents are given in mM and abdomen lipids in nmol/mg.* ○ *below 2 hr;* ▽ *1 hr 30;* △ *2 hr;* ▼ *4 hr;* ▲ *6 hr;* ◇ *12 hr;* ◆ *24 hr;* □ *36 hr.*

TABLE 1

Correlation and Regression Parameters Describing the Action of the Bti Toxin on the Relations between Total Lipids and Total Carbohydrates in A. aegypti Larvae

	Toxin doses (mg · ml^{-1})				
	0.00	0.01	0.02	0.10	1.00
ρ (*N*)	−0.72 (9)	−0.87 (8)	−0.75 (5)	−0.93 (6)	+0.92 (5)
P	0.03	0.005	0.14	0.008	0.025
d	−0.18	−0.23	−0.11	−0.52	+1.39
$\pm\sigma_d$	±0.05	±0.04	±0.04	±0.09	±0.3
Comparisons of slopes (*d*)				0.5.10-3	
				$P = 0.001$	
			$P = 0.03$		
			$P = 0.021$		
			$P = 0.05$		

tal carbohydrates, as illustrated in Fig. 1A. The parameters are given in Table 1.

There appeared to be two particular relations respectively between fatty acids and glucose (Fig. 1B) and for phospholipids versus trehalose (Fig. 1D). In the first case, the relation appears hyperbolic (see parameters in Table 2) and is straightened by plotting fatty acid concentrations versus the reciprocal of glucose values (Fig. 1C). Then, the correlation is of higher significance: $\rho = 0.89$, $P = 0.003$, $d = 15.1$, $\sigma_d = 2.8$. The correlation between phospholipids and trehalose is likely linear, with the parameters given in Table 3.

2. *Alterations of the Functional Relationships under Toxin Action*

Figure 2 illustrates the various patterns obtained for total lipids versus total carbohydrates with the four toxin doses, and the statistical parameters are given in Table 1. Doses of 0.01 and 0.02 mg · liter^{-1} are similar to the controls. Dose of 0.10 mg · liter^{-1} significantly decreased the numerical value of the slope by 264%. In contrast, a dose of 1 mg · liter^{-1} reverses the natural relationship to a strong positive correlation, the slope of which is significantly higher than all others.

Figure 3 shows the particular variations of fatty acids versus glucose relationships. The increasing doses of toxin progressively increase the algebraic value of the slopes of the relationships as indicated in Table 2. A dose/effect relationship can be discerned when slopes are plotted versus toxin concentrations (Fig. 3E).

Figure 4 illustrates the particular variations of phospholipids versus trehalose

TABLE 2

Correlation and Regression Parameters Describing the Action of the Bti Toxin on the Relations between Fatty Acids and Glucose in A. aegypti Larvae

	Toxin doses (mg · ml^{-1})				
	0.00	0.01	0.02	0.10	1.0
ρ (*N*)	−0.69 (8)	−0.95 (5)	−0.85 (6)	−0.75 (5)	−0.74 (7)
P	0.058	0.01	0.03	0.14	0.058
d	−0.77	−0.79	−0.34	−0.12	−0.11
$\pm\sigma_d$	±0.23	±0.14	±0.09	±0.05	±0.03
Comparisons of slopes (*d*)			$P = 0.034$		
			$P = 0.026$		
			$P = 0.003$		

TABLE 3

Correlation and Regression Parameters Describing the Action of the Bti Toxin on the Relations between Phospholipids and Trehalose in A. aegypti Larvae

	Toxin doses (mg · ml^{-1})				
	0.00	0.01	0.02	0.10	1.00
ρ (*N*)	−0.88 (12)	−0.79 (7)	+0.37 (8)	+0.17 (6)	+0.50 (5)
P	$1.6.10^{-4}$	0.034	0.37	0.75	0.39
d	−0.29	−0.11	+0.21	+0.56	+0.76
$\pm\sigma_d$	±0.04	±0.03	±0.08	±0.27	±0.38
Comparisons of slopes (*d*)	*P* = 0.026				
		P = 0.0007			
			P = 0.017		
				P = 0.026	

concentrations. Again, the slopes progressively increase up to positive values with increasing toxin doses.

3. *Near-Death Symptoms*

In larvae exhibiting near-death symptoms, most of the lipid versus carbohydrate pairs of data do not fit the relations established from normal-looking larvae. In Table 4, the numerical value of the carbohydrate concentration has been introduced into the regression equations, and the expected theoretical value for lipid, as obtained on the curve, has been reported and compared to the observed value by the *t* test.

DISCUSSION

In *A. aegypti*, as in most other insects, the major fractions of fatty acids are distributed between 16:0 and 18:2 configurations (8, 9). The metabolic interconversion of glucose into total and various lipid fractions has been studied by Duggal and Subramanyam (10) in fourth instar larvae of *Culex*

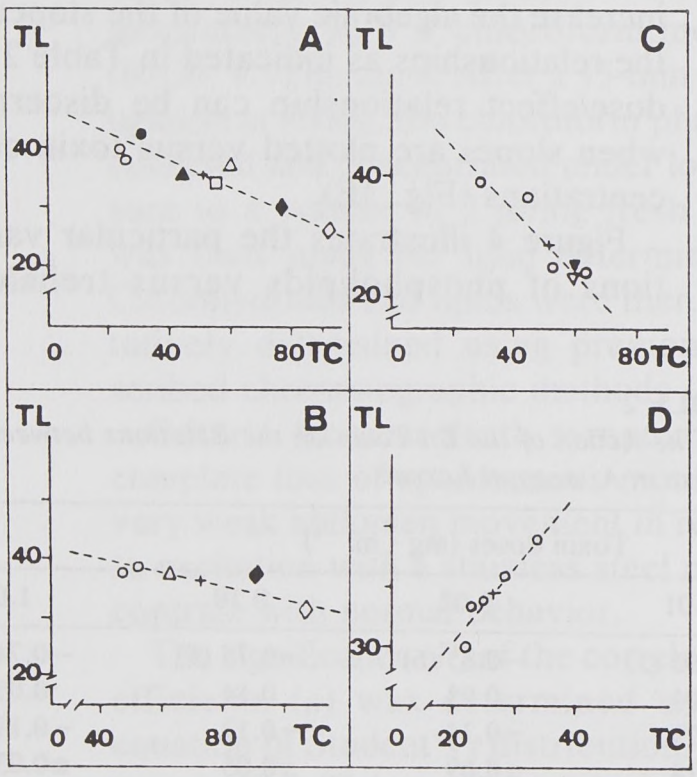


FIG. 2. *Action of four toxin doses on the correlations between total lipids (TL) and total carbohydrates (TC) in A. aedypti larvae. A, 0.01 mg · liter*$^{-1}$*; B, 0.02 mg · liter*$^{-1}$*; C, 0.10 mg · liter*$^{-1}$*; D, 1.0 mg · liter*$^{-1}$*. Symbols are as in Fig. 1.*

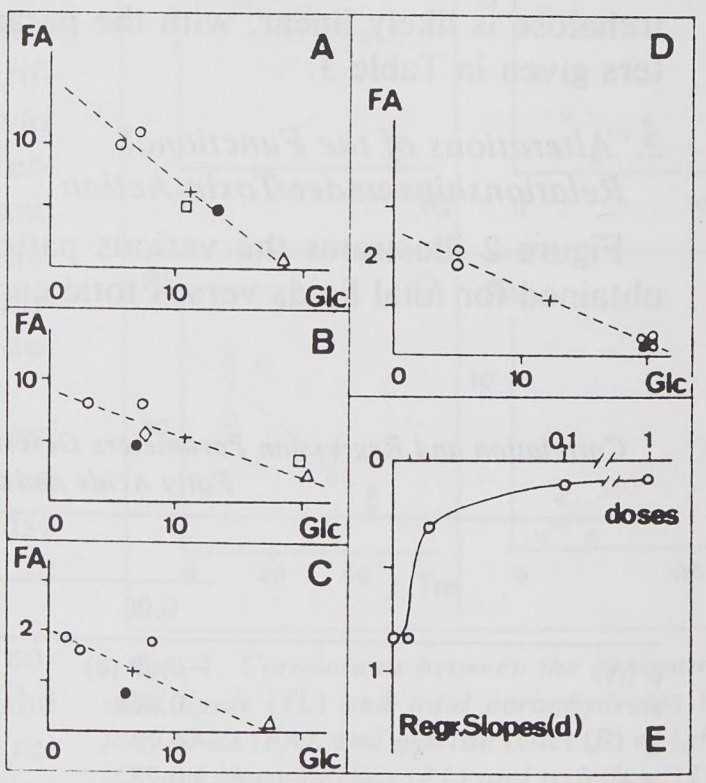


FIG. 3. *Action of four toxin doses on the correlations between fatty acids and glucose, in A. aegypti larvae. A, 0.01, mg · liter*$^{-1}$*; B, 0.02 mg · liter*$^{-1}$*; C, 0.10 mg · liter*$^{-1}$*; D, 1.0 mg · liter*$^{-1}$*; E, dose–effect relationship using the regression slopes "d".*

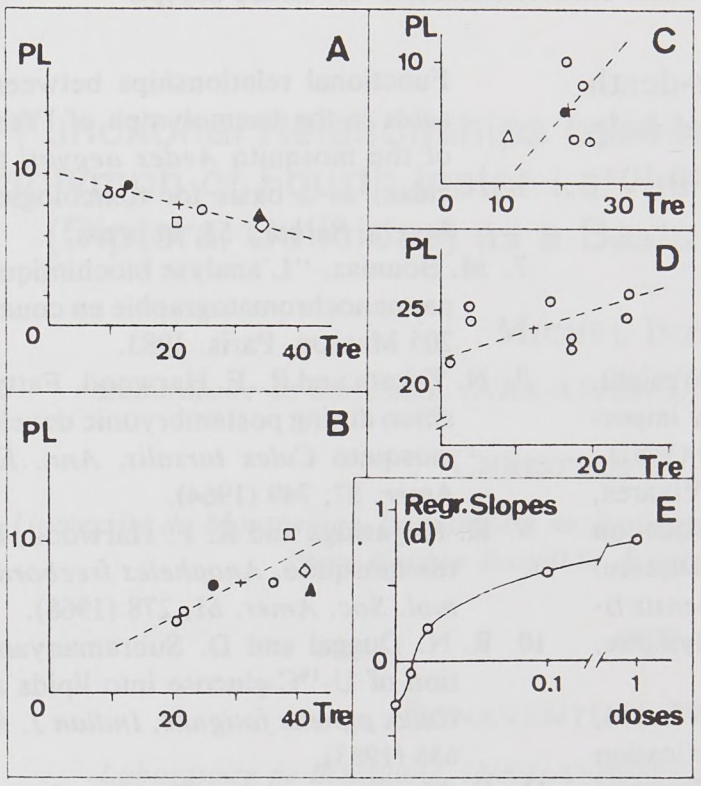


FIG. 4. *Action of four toxin doses on the correlations between phospholipids and trehalose in A. aegypti larvae. A, 0.01 mg · liter^{-1}; B, 0.02 mg · liter^{-1}; C, 0.10 mg · liter^{-1}; D, 1.0 mg · liter^{-1}; E, dose–effect relationship using the regression slopes "d".*

pipiens fatigans. The negative correlations observed between total lipid and total carbohydrates thus reflect a general consequence of these processes. The fatty acid versus glucose correlations indicate that the abdomen fatty acids are produced at the expense of hemolymph glucose, whereas phospholipids, which have been shown to be labeled by [U-^{14}C]glucose within 0.5 to 4 hr (10), are apparently better linked to hemolymph trehalose levels. This comes from the fact that part of the glucose split from trehalose is used in various other metabolic pathways, whereas a large proportion of the trehalose phosphate released from glycogenolysis (11) is more readily converted into phospholipids through appropriate metabolic pathways. This is confirmed by the rapid labeling of phospholipids via triacylglycerol from [U-^{14}C]trehalose (12).

TABLE 4

Fitting of Pairs of Data Obtained from Agonizing Larvae, to the Functional Relationships Obtained with Normal-Looking Larvae

	Doses (mg · ml^{-1})			
	0.01	0.02	0.10	1.00
Total carbohydrates	30.6	98.1	37.0	30.6
Total lipids (*N*)	(8)	(5)	(7)	(5)
Observed	34.8	39.7	32.5	31.9
Expected	30.8	28.7	30.3	44.5
$P_{(t)}$	0.05	0.30[a]	0.06	8.10^{-3}
Glucose	17.1	9.7	21.3	17.1
Fatty acids (*N*)	(5)	(6)	(5)	(7)
Observed	2.4	2.2	1.45	1.3
Expected	1.64	5.63	−0.50	0.53
$P_{(t)}$	0.17[a]	10^{-5}	0.06	3.10^{-5}
Trehalose	5.0	4.2	5.4	5.0
Phospholipids (*N*)	(7)	(8)	(6)	(5)
Observed	25.1	36.4	18.2	18.3
Expected	9.6	1.7	−2.6	23.2
$P_{(t)}$	3.10^{-4}	4.10^{-8}	9.10^{-6}	0.002

[a] Not significant differences.

It should be emphasized that the rapid interconversion between lipids and carbohydrates can be elicited in insects according to physiological demand (13) and thus reflects a quite general feature.

It has been demonstrated that the *Bti* δ-endotoxin acts in several insect species after solubilization and transformation in the gut (14). Recent data have provided evidence that in the 2–4 μg · ml^{-1} dose range there is a neurotoxic action with an inhibition of transmitter release and a blockage of synaptic transmission preceded by a massive transmitter release at a higher dose range (12 μg · ml^{-1}) (15).

The present study provides evidence that the interconversion of carbohydrates into lipids is adversely affected by increasing toxin doses. Several mechanisms seem to be involved in such effects. The hydrolysis of trehalose into glucose by increasing toxin doses (2) results in a rapid lack of metabolic trehalose which may be more slowly replaced in severely intoxicated larvae. It would be interesting indeed to check for the possible direct action of the toxin on the enzymatic systems involved in the biosynthesis of lipids from carbohydrates. On the other hand, lipid and carbohydrate variations might also reflect the action of neurohormones which could also be affected in parallel to the release of transmitters.

Finally, it is noteworthy that the relationships established for living treated larvae

do not hold for larvae at the near-death stage. Such observations might be of help in the search for the frontier between toxicity and mortality.

REFERENCES

1. D. W. Roberts, R. A. Daoust, and S. P. Wraight, Bibliography on pathogens of medically important arthropods, *WHO/VBC Rep.* 83, 1 (1981).
2. B. Nizeyimana, M. Bounias, and C. P. Vivarès, Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de *Aedes aegypti* (Insecte, Diptère) par la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*. I. Les glucides de l'hémolymphe, *C.R. Soc. Biol.* 180, 551 (1986).
3. B. Nizeyimana, M. Bounias, and C. P. Vivarès, Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de *Aedes aegypti* (Insecte, Diptère) par la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*. II. Les lipides abdominaux, *C.R. Soc. Biol.* 181, 355 (1987).
4. M. Bounias, Modifications des relations quantitatives entre les pigments photosynthétiques et les acides aminés libres chez quelques mutants chlorophylliens d'Orge d'Arabidopsis, *Canad. J. Bot.* 53, 708 (1975).
5. M. Bounias, R. Moreau, and L. Gourdoux, Une inter-relation entre glucose et acides gras, induite dans l'hémolymphe d'abeilles par l'injection d'insuline spécifique et supprimée par la somatostatine de vertébrés, *C.R. Acad. Sci. Ser. 3* 300, 623 (1985).
6. M. Bounias, C. P. Vivarès, and B. Nizeyimana, Functional relationships between free amino-acids in the haemolymph of IVth instar larvae of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, culicidae) as a basis for toxicological studies, *J. Invert. Pathol.*, 53, in press.
7. M. Bounias, "L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince," p. 205 Masson, Paris, 1983.
8. N. Takata and R. F. Harwood, Fatty acid composition during postembryonic development of the mosquito *Culex tarsalis*, *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 57, 749 (1964).
9. K. Hayashiga and R. F. Harwood, Fatty acids of the mosquito, *Anopheles freeborni*, *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 61, 278 (1968).
10. R. N. Duggal and D. Subramanyam, Incorporation of U-^{14}C-glucose into lipids and sugars of *Culex pipiens fatigans*, *Indian J. Med. Res.* 78, 636 (1983).
11. G. M. Chippendale, The functions of carbohydrates in insect life processes, *in* "Biochemistry of Insects" (M. Rockstein Ed.), p. 32, Academic Press, New York, 1978.
12. M. B. Lakshmi and D. Subrahmanyam, Trehalose of *Culex pipiens*, *Experientia* 31, 898 (1975).
13. G. J. Goldsworthy, A. R. Justum, and N. L. Robinson, Substrate utilization and flight speed during tethered flight in the locus, *J. Insect Physiol.* 25, 183 (1979).
14. F. Jaquet, R. Hüthy, and P. Lüthy, Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin, *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 500 (1987).
15. G. J. P. Singh and S. S. Gill, Myotoxic and neurotoxin, *Pestic. Biochem. Physiol.* 24, 406 (1985).

JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY 54, 16–22 (1989)

Functional Relationships between Free Amino Acids in the Hemolymph of Fourth Instar Larvae of the Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) as a Basis for Toxicological Studies

MICHEL BOUNIAS

Laboratoire de Biochimie, INRA-AVIGNON, BP 91, F 84140 Montfavet, France

CHRISTIAN P. VIVARÈS

Université de Montpellier, Laboratoire de Pathologie Comparée, UA INRA-CNRS No. 1184, Place Eugène Bataillon, F 34060 Montpellier, France

AND

BONAVENTURE NIZEYIMANA

Laboratoire de Biochimie, INRA-AVIGNON, BP 91, F 84140 Montfavet, France

Received June 20, 1988; accepted October 11, 1988

Characteristic correlations reflecting particular metabolic interactions between free amino acids have been pointed out and used as a sensitive test for the detection of biochemical intoxication symptoms in fourth instar larvae of the mosquito *Aedes aegypti* exposed for 0–8, 12, 24, and 36 hr to various doses of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin ranging from 0.01 to 1 mg liter^{-1}. In a first pool, serine was negatively correlated with glycine while cystine and alanine were positively correlated with serine and proline. A second pool was characterized by strong positive correlations between leucine, valine, isoleucine, and threonine. These two groups were linked by a negative (hyperbolic) correlation between cystine and threonine. Preliminary data then gave evidence that the slopes of the linear regressions of Gly on Ser and Ala on Ser increased and those of Ile on Thr and Val on Leu decreased with increasing doses of *B. thuringiensis israelensis* δ-endotoxin. Functional relationships thus exhibited a high semiological value in metabolic stress studies. © 1989 Academic Press, Inc.

KEY WORDS: *Aedes aegypti;* toxicological study; free amino acid hemolymph; metabolic correlation; *Bacillus thuringiensis israelensis* endotoxin; biological control.

INTRODUCTION

For quite some time attention has been focused on the amino acid composition of the whole body of mosquitoes. As early as 1952, Micks and Ellis identified most of the components of *Aedes aegypti* larvae by qualitative paper chromatography, and so did Clark and Ball (1952) on adults. Then, Thayer and Terzian successively proposed a first quantitative evaluation in 1962 and, in 1970, a more thorough study, using an amino acid analyzer, still on the whole body of adults. According to these various data, most proteic amino acids and a number of nonproteic ones were found to be present in their free form, except aspartic acid and phenylalanine, generally absent, and methionine and tryptophan, only present in trace amounts.

Qualitative differences among various *Culex* spp. have been evidenced by Ball and Clark (1954), whereas only low quantitative variations were reported by Chaput and Liles (1969) from third instar larvae to pupae of *A. aegypti*. These authors concluded from their study that "no specific correlation of amino acid changes with development was possible."

In addition to this apparent stability, modifications of free amino acid concentrations by infectious factors have been re-

0022-2011/89 $1.50
Copyright © 1989 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

154

ported by Domnas et al. (1974) in *Culex* sp. and by Mack et al. (1979) in *Anopheles*. Recent results in our laboratory also gave evidence for significant modifications brought to the amino acid composition of fourth instar larvae of *A. aegypti* by action of the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Nizeyimana, 1985; Bounias et al., 1986). However, the sole examination of the variations of individual concentrations may be of less interest than considering the algebraic characteristics of particular relationships between pairs of amino acids.

In effect, because the larvae are no longer fed during the fourth instar, such correlations, established on the basis of compared variations from 0 to 36 hr, are assumed to reflect a balance of metabolic interconversions rather than nutritional intakes. Then, a biochemical stress would result in one of the following three possibilities: (i) The concentration of a given compound can be situated within the range of control values, but out of the normal correlation with another compound. (ii) The concentration of at least one of the two correlated metabolites can be situated out of the normal range, but still on the (prolongation of the) normal curve. (iii) In extreme cases, concentrations cannot be in the range of normal values or on the control correlation with other compounds.

Such considerations have already provided powerful means of characterization of biochemical stresses, including large modifications of the algebraic properties of functional relationships between various biochemical compounds (Bounias, 1975, 1983b), and interesting applications were thus to be expected in the case of the intoxication of *Aedes* larvae by the bacterial endotoxin.

Accordingly, sensitive means of detecting biochemical consequences of the intoxication are expected from the proposed method, and, in addition, qualitative information is likely to be deduced from the nature of the observed variations, with respect to the involved metabolic pathways.

MATERIAL AND METHODS

Animals and sampling. A. aegypti larvae were reared as previously described (Nizeyimana, Bounias, and Vivarès, 1986) to the fourth instar where they were distributed into small jars (25 each) containing 200 ml of water. For toxicological studies, 1 ml of toxin suspension was added to 199 ml of water.

Jars were placed in dim light at 25° ± 1°C and, under such conditions, larvae could be maintained for 36 hr before the start of pupation. At time zero and then at 1–8, 12, 24, and 36 hr they were collected and the hemolymph was extracted at the tip of the abdomen after cutting the siphon. A range of 4 to 8 μl of hemolymph was thus collected from 20 larvae to using Hamilton microsyringes and immediately injected into microtubes (2–4 mm ϕ × 30 mm height) under a decane layer which prevented the melanization of samples.

Chromatographic methods. The separation and quantitation of free amino acids was achieved using techniques derived from those previously described (Bounias, 1980, 1983a) (Table 1). Sample volumes of 0.5 μl of hemolymph were spotted on silica gel or cellulose-coated thin-layer plates using 1-μl total-capacity Hamilton syringes. Amino acids were identified, after ninhydrin visualization, using their UV-visible spectra and their comparative chromatographic mobilities on silica gel and cellulose layers, using eight different eluant systems (Nizeyimana, 1985). Visualization was achieved through a uniform spraying of a freshly prepared mixture (Bounias, 1983a) of: ninhydrin, 0.1 mg; butanol-1, 8.0 ml; acetone, 16.25 ml; acetic acid, 0.75 ml.

Plates were then dried by cold air pulse and placed in an oven at 100°C for 3 min. They were immediately recorded using a CS930 spectrodensitometer at 550 and 580 nm for all amino acids and at 330 and 350 nm for proline determinations. One calibration curve was established for each amino acid. Curves were linearized by the conver-

TABLE 1
CHROMATOGRAPHIC SYSTEMS USED IN THE ANALYSIS OF THE HEMOLYMPH AMINO ACIDS OF *Aedes aegypti* LARVAE

System[a] (solid phase)	Eluants	Distance[b] (cm)	Duration at 20°C
I. Silica gel (Merck 5748)	(1) Ethanol:propanol-1:aceto-nitrile:water (20–25–30–25, v/v)	(1) 7 (2) 14	1 hr 1.8 hr
	(2) Propanol-1:ethylmethylketone: water (55–25–20, v/v)	14	1 hr
	(3) Butanol-1:methanol:water (23–47–30, v/v)	(1) 2.5 (2) 2.8	5 min
II. Silica gel (Merck 5748)	Butanol-1:methanol:water (23–47–30)	(1) 10 (2) 14	1.5 hr 2.5 hr
III. Cellulose (Merck 5577)	(1) Isopropanol:water (75–25, v/v)	(1) 12 (2) 14	2.5 hr 3 hr
	(2) Isopropanol:water (60–40, v/v)	(1) 6 (2) 8	1 hr 1.5 hr

Note. Cylindric jars (13 cm ϕ × 22 cm height) were used. They were coated with filter paper on half the diameter for vapor saturation and needed a total of 80 ml of solvent.

[a] Separated amino acids (by order of increased mobilities): I. Lys, Arg, His, Cys, Ser, (Asn + Gly), Asp, (Gln + Glu + Thr), (Ala + Pro), Val, Met, Ile, (Leu + Phe), Trp; II. Lys, Arg, His, Cys, Ser, (Asn + Gly), Asp, (Glu + Gln + Thr), Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu, Phe + Tyr, Trp; III. Lys, (Arg + Cys), (His + Cys), (Asp + Asn + Ser), Gly, (Glu + Gln), Thr, Ala, Pro, Trp, Tyr, (Val + Met), Phe, Ile, Leu.

[b] Two successive elutions are separated by a short drying by pulsed air at room temperature.

sion of peak areas (S) into $S^x = p \cdot Q$, where Q is the spotted quantity, p the actual calibration coefficient, and x an exponent determined for each amino acid.

Statistical methods. The probabilites of significance (P) associated with the values of correlation coefficients (ρ) were calculated from the equation of Student's t distribution. The standard deviations of the regression slopes (b) were given by $\sigma_b = [(b/\rho)^2 - b^2)/(N - 2)],^{1/2}$ where N is the number of pairs of data.

RESULTS

Table 2 indicates the basic values determined in the hemolymph of larvae over the 36 hr of duration of the fourth instar. The total amount oscillated an average value of approx 64.6 ± 16.6 nmol · μl^{-1}. Aspartic acid and tryptophan were the only amino acids that were never obtained in significant amounts. Methionine was present at the limit of detection and tyrosine concentrations were significant, although with large variability, only at the beginning and at the end of the instar.

An examination of the compared variations of the concentrations of the various amino acids allowed a number of correlations to be made in two major metabolic pools and in a few others.

(*A*) *Serine–glycine–alanine–cysteine–proline.* Plotting glycine versus serine and alanine versus serine concentrations, respectively, gave the following parameters (Fig. 1):

Gly/Ser: $\rho = -0.60$ ($N = 22$; $P = 0.003$); $b = -0.33$ ($\sigma_b = 0.01$)

Ala/Ser: $\rho = 0.41$ ($N = 25$; $P = 0.04$); $b = 0.48$ ($\sigma_b = 0.22$).

Then the following correlations emerged, by considering cysteine and proline:

Cys/Ser: $\rho = -0.93$ ($N = 22$; $P = 0.0001$); $b = -1.90$ ($\sigma_b = 0.39$)

156

TABLE 2
BASIC FREE AMINO ACIDS COMPOSITION OF THE HEMOLYMPH OF FOURTH INSTAR LARVAE OF *Aedes aegypti*

Amino acids (mM)	0–8 hr			12 hr			24 hr			36 hr		
	$\bar{x}$	(*N*)	σ	$\bar{x}$	(*N*)	σ	$\bar{x}$	(*N*)	σ	$\bar{x}$	(*N*)	σ
Lys	2.3	(5)	0.1	4.6	(6)	1.3	3.9	(3)	0.2	5.7	(3)	0.8
Arg	2.5	(5)	0.9	1.7	(8)	0.4	1.5	(3)	0.3	2.4	(3)	0.5
His	3.5	(5)	0.9	4.2	(8)	1.8	3.6	(5)	1.9	1.9	(3)	0.1
Cys	6.6	(5)	4.0	6.5	(8)	2.5	8.6	(5)	1.7	4.0	(3)	0.2
Asp	Tr			Tr			Tr			Tr		
Asn	1.5	(4)	0.2	1.0	(9)	0.8	0.9	(4)	0.4	1.4	(4)	0.5
Ser	3.4	(5)	0.9	4.9	(9)	1.1	2.7	(4)	1.0	5.0	(4)	0.2
Gly	1.9	(5)	0.4	1.3	(6)	0.1	1.4	(3)	0.5	0.3	(3)	0.02
Glu + Gln	7.7	(5)	2.1	10.7	(10)	2.1	10.7	(4)	1.6	9.0	(4)	1.7
Thr	4.2	(5)	2.0	5.2	(10)	1.8	3.2	(4)	0.4	8.3	(5)	1.3
Ala	3.0	(5)	0.5	4.4	(7)	0.7	4.1	(3)	0.6	6.0	(4)	1.0
Pro	7.8	(5)	2.2	13.8	(8)	7.6	6.0	(4)	2.6	13.5	(4)	2.0
Trp	Tr			Tr			Tr			Tr		
Val	1.8	(5)	1.6	3.2	(6)	2.9	0.9	(3)	0.1	6.8	(3)	1.2
Met	0.001	(5)	ND	Tr			0.1	(3)	0.1	Tr		
Phe	0.2	(5)	0.2	0.2	(6)	0.2	0.1	(3)	0.1	1.5	(4)	0.1
Tyr	0.9	(5)	0.7	Tr			Tr			1.1	(3)	1.0
Ile	1.1	(5)	0.8	1.4	(7)	1.2	0.1	(3)	0.1	4.2	(3)	0.4
Leu	1.5	(5)	1.2	3.0	(7)	2.5	0.5	(3)	0.4	4.7	(3)	0.9

Note. Means ($\bar{x}$) and SD (σ) are given for (*N*) determinations. Z_1 to Z_5, unidentified compounds. Amino acids are likely placed by order of polarities. Tr, traces; ND, not determined.

Ala/Pro: $\rho = 0.79$ ($N = 7$; $P = 0.002$); $b = 0.22$ ($\sigma_b = 0.08$).

(*B*) Leucine–isoleucine–valine–threonine. Very strong correlations emerge from plotting isoleucine versus threonine and valine versus leucine (Fig. 2).

Ile/Thr: $\rho = 0.91$ ($N = 22$; $P = 0.0001$); $b = 0.65$ ($\sigma_b = 0.07$)

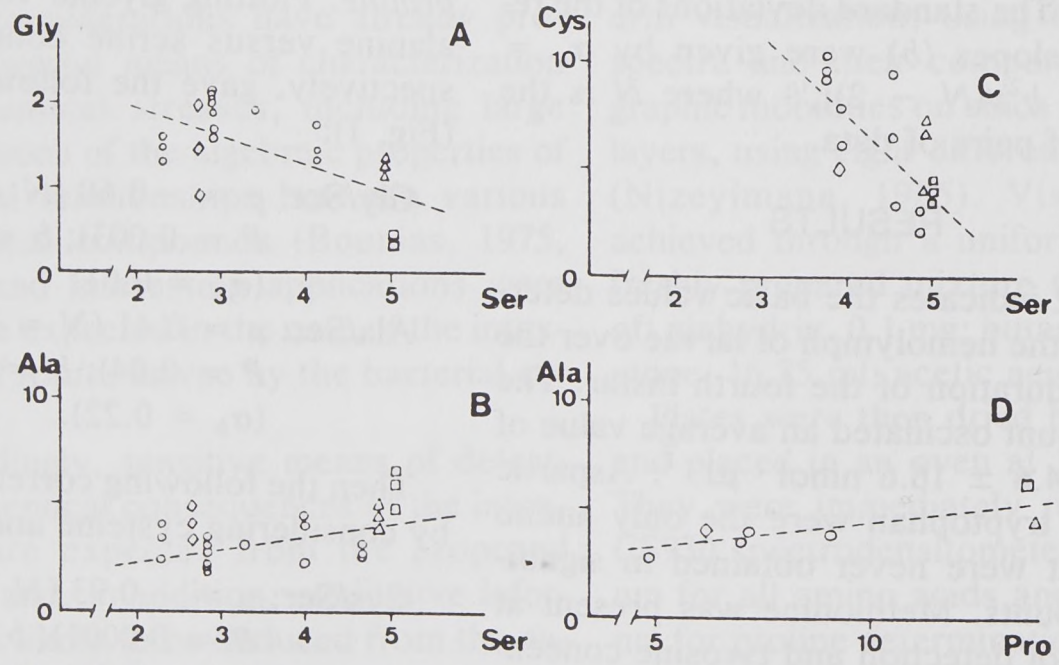


FIG. 1. Correlations between the natural concentrations of glycine, alanine, and cysteine versus serine and alanine versus proline in the hemolymph of fourth instar larvae of *Aedes aegypti*. ○, from 0 to 8 hr; △, 12 hr; ◇, 24 hr; □, 36 hr.

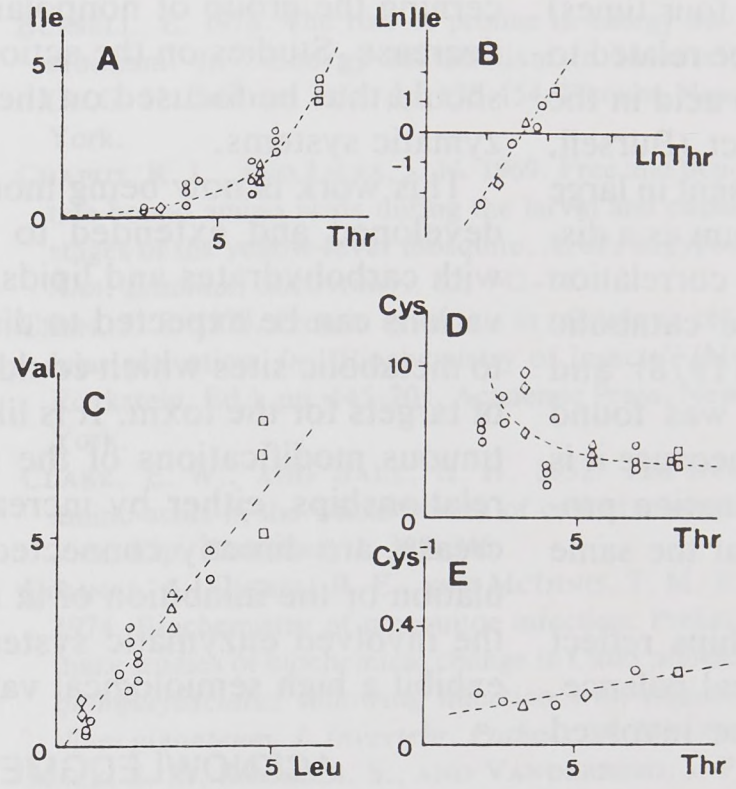


FIG. 2. Correlations between the natural concentrations of isoleucine and cysteine versus threonine and valine leucine in the hemolymph of fourth instar larvae of *Aedes aegypti*. Symbols are as on Figure 1. Transformed curves are illustrated with average points of the various series of experiments.

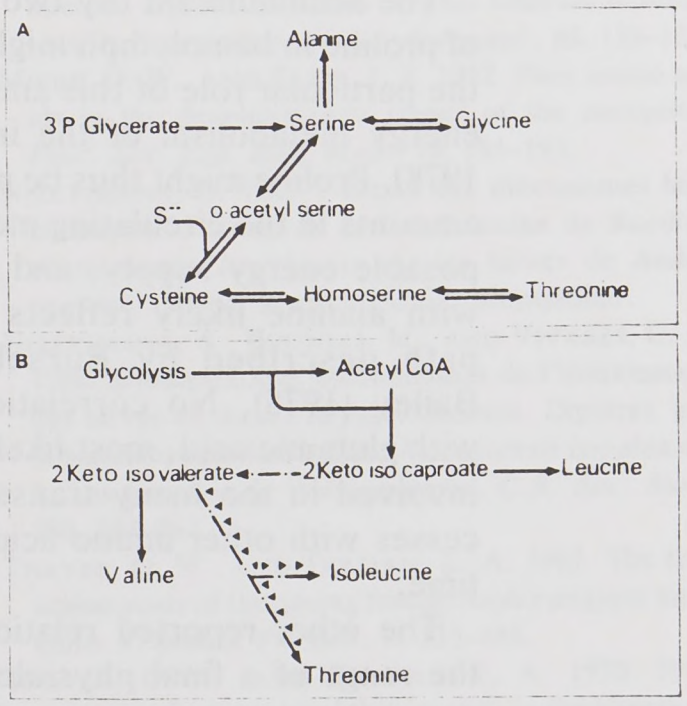


FIG. 3. Metabolic pathways likely involved in the observed correlations. (A) First pool; (B) second pool. (⇆) Negative correlations; (⇉) positive correlations; (→) universal pathways; (►►►►) microorganisms known pathways; (–·–·→) plant known pathways.

Val/Leu: $\rho = 0.95$ ($N = 25$; $P = 0.0001$); $b = 0.46$ ($\sigma_b = 0.09$).

Assuming that these pairs can thus be associated, a secondary correlation can be found by plotting the sum (Ile + Thr) versus (Val + Leu): the corresponding parameters are $\rho = 0.72$ ($N = 24$; $P = 0.007$); $b = 0.46$ ($\sigma_b = 0.09$).

(*C*) Other correlations. An apparently much weaker correlation was then observed between cysteine and threonine, making a bridge over the two previous pools:

Cys/Thr: $\rho = -0.44$ ($N = 22$; $P = 0.04$); $b = -0.42$ ($\sigma_b = 0.1$).

But, in this case, the relation looked hyperbolic (Fig. 2D) and could be significantly linearized by plotting Cys^{-1} versus Thr:

Cys^{-1}/Thr: $\rho = 0.76$ ($N = 22$; $P < 0.0001$); $b = 0.02$ ($\sigma_b = 0.004$).

Last, a weak correlation could also be discerned between the group (glutamic acid + glutamine) and histidine:

(Glu + Gln)/His: $\rho = 0.50$ ($N = 15$; $P = 0.057$); $b = 0.97$ ($\sigma_b = 0.46$).

Figure 3 illustrates the most likely involved metabolic pathways.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The total amount of free amino acids in the hemolymph of fourth instar larvae was of the same order (although slightly higher) as values previously reported in the whole body of adults (Thayer and Terzian, 1970). The comparison of individual amino acid concentrations with those reported by Chaput and Liles (1969) in the whole body of fourth instar larvae of *A. aegypti* revealed large similarities with our results in pure hemolymph for Lys, His, Ser, Gly, Glu + Gln, Thr, Phe, Ile, and Leu.

By contrast, Pro, Cys, and Val were more concentrated, and Arg, Asp + Asn, Ala, Met, and Tyr were less concentrated, in hemolymph.

The accumulation (by two to four times) of proline in hemolymph might be related to the particular role of this amino acid in the energy metabolism of the insect (Bursell, 1978). Proline might thus be present in large amounts in the circulating medium as a disposable energy supply, and its correlation with alanine likely reflects the catabolic path described by Bursell (1978) and Bailey (1978). No correlation was found with glutamic acid, most likely because it is involved in too many transamination processes with other amino acids at the same time.

The other reported relationships reflect the range of a final physiological balance, depending on the nature of the involved metabolic pathways.

It is interesting to note that, in addition to the broadly known interconversion of serine and glycine (Chen, 1978), serine, alanine, and glycine are among the major components of fibroin (Agosin, 1978), so that trouble observed at this level, after intoxication, might also reflect alterations in fibroin-like metabolism and functions. Preliminary data summarized in Table 3 have shown that most of the correlations observed in healthy larvae may well serve as basic criteria for the appreciation of the effects of an intoxication by the δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. The slopes of the relations involving serine increase with increasing toxin doses, whereas those concerning the group of nonpolar amino acids decrease. Studies on the action of the toxin should thus be focused on the involved enzymatic systems.

This work is now being more thoroughly developed and extended to relationships with carbohydrates and lipids. Such observations can be expected to direct attention to metabolic sites which could play the part of targets for the toxin. It is likely that continuous modifications of the slopes of the relationships, either by increase or by decrease, are directly connected to the stimulation or the inhibition of at least some of the involved enzymatic systems, and thus exhibit a high semiological value.

TABLE 3

PRELIMINARY DATA ON THE ALTERATION OF THE SLOPES OF FUNCTIONAL RELATIONSHIPS BY ADMINISTRATION OF VARIOUS DOSES OF BTI δ-ENDOTOXIN (12,000 IU/mg)

	Doses (mg^{-1})				
Relations	0.0	0.01	0.02	0.1	1.0
Gly/Ser	−0.33	−0.3	−0.2	0.5	0.8
Ala/Ser	0.48	0.8	NS	2.4	3.4
Ile/thr	0.65	0.2	0.03	NS	0.1
Val/Leu	1.4	0.8	1.3	1.0	0.6

Note. Results are given for N = 14–24. NS, correlations were not significant.

ACKNOWLEDGMENT

The authors express their sincerest thanks to Professor C. Vago for his early interest in this work and his kind encouragements.

REFERENCES

AGOSIN, M. 1978. Functional role of proteins. *In* "Biochemistry of Insects" (M. Rockstein, Ed.), pp. 94–144. Academic Press, New York.

BAILEY, E. 1978. Biochemistry of insect flight. Part 2. Fuel supply. *In* "Insect Biochemistry and Function" (D. J. Candy and B. A. Kilby, Eds.), pp. 89–168. Chapman and Hall, London.

BALL, G. H., AND CLARK, E. W. 1954. Species differences in amino acids of *Culex* mosquitoes. *System. Zool.*, 2, 138–141.

BOUNIAS, M. 1975. Modifications des relations quantitatives entre les pigments photosynthetiques et les acides aminés libres chez quelques mutants chlorophylliens d'orge et d'arabidopsis. *Canad. J. Bot.*, 53, 708–719.

BOUNIAS, M. 1980. Microanalyse quantitative de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes. II. Les acides aminés libres. *Analusis*, 8, 287–295.

BOUNIAS, M. 1983a. "L'analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince." Masson Editeur, Paris.

BOUNIAS, M. 1983b. "Caractérisation des traumatismes biochimiques végétaux: Application à l'étude des dismétabolismes consécutifs à un évènement d'origine inconnue." Rapport final, Contrats CNES/INRA Nos. 80-0796 et 83-009.

BOUNIAS, M., NIZEYIMANA, B., AND VAGO, C. 1986. Etude de l'action de la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israëlensis* sur des relations biochimiques fonctionnelles chez le diptère *Aedes aegypti*. *C.R. Acad. Sci. Ser. III*, 303, 285–289.

159

BURSELL, E. 1978. The role of proline in energy metabolism. *In* "Energy Metabolism in Insects" (R. G. H. Downer, Ed.), pp. 135–154. Plenum, New York.

CHAPUT, R. L., AND LILES, J. N. 1969. Free and peptide-bound amino acids during the larval and pupal stages of the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 62, 742–747.

CHEN, P. S. 1978. Protein synthesis in relation to cellular activation. *In* "Biochemistry of Insects" (M. Rockstein, Ed.), pp. 145–201. Academic Press, New York.

CLARK, E. W., AND BALL, G. H. 1952. The free amino-acids in the whole bodies of culicid mosquitoes. *Exp. Parasitol.*, 1, 339–346.

DOMNAS, A., GIEBEL, P. E., AND MCINNIS, T. M. R. 1974. Biochemistry of mosquitoe infection: Preliminary studies of biochemical change in *Culex pipiens quinquefasciatus* following infection with *Lagenidium giganteum*. *J. Invertebr. Pathol.*, 24, 293–304.

MACK, S. R., SAMUELS, S., AND VANDERBERG, J. P. 1979. Haemolymph of *Anopheles stephensi* from uninfected and *Plasmodium berghei* infected mosquitoes. 2. Free amino acids. *J. Parasitol.*, 65, 130–136.

MICKS, D. W., AND ELLIS, J. P. 1952. Free amino acids in the developmental stages of the mosquito. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 79, 191–193.

NIZEYIMANA, B. 1985. "Etude des mécanismes biochimiques d'action de la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis* sur les larves de *Aedes aegypti*." Thèse 3e cycle, Univ. Montpellier.

NIZEYIMANA, B., BOUNIAS, M., AND VIVARÈS, C. P. 1986. Manifestations biochimiques de l'intoxication des larves de *Aedes aegypti* (Insecte, Diptère), par la δ-endotoxine de *Bacillus thuringiensis israelensis*. I. Les glucides de l'hémolymphe. *C.R. Soc. Biol.*, 180, 551–563.

THAYER, D. W., AND TERZIAN, L. A. 1962. The free amino acids of the ageing female *Aedes aegypti* mosquito. *J. Insect. Physiol.*, 8, 133–143.

THAYER, D. W., AND TERZIAN, L. A. 1970. Free amino acids and related compounds in the tissues of ageing female *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.*, 16, 1–15.

2- Lutte contre la varroose de l'abeille.

Collaboration avec la Yougoslavie et la Belgique.

L'efficacité de l'utilisation des sels de cuivre administrés par voie systémique, contre le parasite des abeilles, Varroa jacobsoni, est pleinement confirmée après trois années d'expérimentation à grande échelle. Un manuscrit a été accepté par le Journal of Apicultural Research.

Les effets non intentionnels du cuivre, chez l'abeille, font l'objet de la thèse de Doctorat de Madame Nectoux. La soutenance est prévue pour Juin 1990.

Les recherches ont été poursuivies à la fois au niveau de l'efficacité, sur le terrain, et quant aux effets non intentionnels chez l'abeille, avec une série de dérivés organiques du cuivre, présentant de nombreux avantages sur le sulfate, que nous avions considéré comme un modèle expérimental et une "trousse de premier secours".

Notre partenaire Belge*, la Société Bénéchim (Lessines) a déposé successivement :

1 Brevet français N° I.N.P.I. 89-088-99 (24pp)
1 Brevet européen
1 Brevet américain

* C'est grâce à la Ste Bénéchim que les travaux ont pu se poursuivre. Malgré l'opposition des "décideurs", il a donc été prouvé que la "piste du cuivre" était valable. Conclusion, "une fois encore, les décideurs ont été désavoués par les faits".

Lutte contre la Varroose (suite)

Synergie entre le cuivre et l'Amitraz®

Collaboration avec la Pologne (Univ. de Szczecin, Inst. de Phys. - Doc. Hab. Dr. I. Kruk)

Les travaux précédents sur l'oxydation des catécholamines m'ont donné l'idée d'examiner le comportement d'autoxydation de l'Amitraz, insecticide acaricide de la famille des formamidines, analogue α-aminergique.

Le Dr. Kruk et son équipe ont établi les paramètres physico chimiques de base, et nous allons maintenant tester l'action des ions cuivriques sur ce phénomène.

Sur le terrain, Nous avions déjà constaté, depuis un an, que les nourrissements par le cuivre potentialisaient l'efficacité des traitements à l'Amitraz, contre le parasite Varroa jacobsoni.

Si l'hypothèse d'un effet protecteur du cuivre était vérifiée, nous aurions, de la sorte, découvert l'explication moléculaire de la synergie constatée

Rendez-vous en 1990...

- Effets non intentionnels sublétaux de l'amitraz® chez l'abeille

L'injection de très faibles doses d'amitraz provoque, chez l'abeille, des effets sur la glycémie de type α adrénergique.

La publication ci-après constitue une partie de la thèse de Doctorat que M. P. Cascino aurait bientôt soutenue, si les "décideurs" n'avaient pas décidé de couper court à ces recherches (tout comme à celles de M. Guiraud sur la prophylaxie de la varroose)

Le travail a été complété, avec le concours de Mlle Khadija M'DIAYE, au niveau des lipides intestinaux. Nous avons montré que l'amitraz est hypolipémiant à 0,25 nanomoles par abeille et que cet effet est complètement neutralisé par 0,25 nanomoles de phentolamine (antagoniste α-adrénergique).

Au cours de la même campagne expérimentale, nous avons, également, exploré les effets du fluvalinate à doses ultrafaibles.

Des effets importants ont été observés sur la glycémie et sur la lipémie de l'abeille à partir de 10^{-15} moles injectées !

163

BIOMEDICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES 2, 106–114 (1989)

The Formamidine Amitraz as a Hyperglycemic α-Agonist in Worker Honeybees (*Apis mellifera mellifera* L.) *in Vivo*

P. CASCINO, M. NECTOUX, G. GUIRAUD, AND M. BOUNIAS[1]

Laboratory of Biochemistry, INRA-Avignon, B.P. 91, F 84140 Montfavet, France

Received December 12, 1988

Intra-abdominal injection of amitraz (0.25 nmol per honeybee, i.e., approx 2.3 nmol/g) to emerging worker bees, *in vivo,* led to a significant hypertrehalosemia (300–400%) followed by a hyperglucosemia ($\approx$600%). Maxima were reached at 0.5 and 2 h, respectively. A strong negative correlation between glucosemia and trehalosemia appeared after injection of pure phentolamine (1 nmol per bee), suggesting stimulation of trehalase activities. Simultaneous administration of the α-blocker at $\geq$0.25 nmol per individual suppressed the hyperglycemic response of amitraz. The formamidine pesticide thus likely acts on the honeybee α-aminergic system. © 1989 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

The involvement of neurohormonal peptides and monoamines in the regulation of honeybee glycemia has been known for a long time (Bounias and Pachéco, 1979a,b; Bounias, 1980). Evidence that the glycemia is correlated closely to the productivity of the hives (Bounias, 1981), i.e., to foraging activity and to pollination which has been shown as essential in agriculture (Barbier, 1986), has been provided.

In recent years (mainly since 1982), the infestation of West European hives by the parasite mite *Varroa jacobsoni* has led beekeepers to use several insecticides/acaricides among which the formamidine amitraz is one of the more widely used (Faucon *et al.,* 1986). This chemical had previously been employed for over 10 years in agriculture and in veterinary practice (Hollingworth, 1976; Folz *et al.,* 1986).

The structural properties of formamidine pesticides (Tosi *et al.,* 1984) have been correlated to their potential action on invertebrate octopamine receptors (Orchard *et al.,* 1982) and shown to act through their monoamine-sensitive adenylate cyclase (Orr *et al.,* 1985; Downer *et al.,* 1985). In invertebrates such as the American cockroach (Downer *et al.,* 1984) the role of octopamine has been indicated as that of an α-agonist effector, whose action on the elevation of cyclic AMP levels can be suppressed

[1] To whom correspondence should be addressed.

0895-3988/89 $3.00
Copyright © 1989 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

by phentolamine. Octopamine is largely distributed in the whole animal kingdom (David and Coulon, 1985) and its presence has also been reported in honeybees (Mercer *et al.*, 1983). However, *in vivo* injections to adult workers have shown that the effects of this hormone are less pronounced on carbohydrates but more marked on lipids than those of noradrenaline (Bounias, 1985, 1986a,b,c, 1988). Noradrenaline, also naturally present in honeybees (Lecomte *et al.*, 1984) and apparently a more potent hyperglycemic amine, shares large structural similarities with octopamine; it could thus be expected that amitraz might show some α-aminergic-type glycemic effects on honeybees, as have recently been found in vertebrates (Costa *et al.*, 1988). The toxicological (nontarget) effects that might result for hives treated with formamidines against the mite prompted us to examine the biochemical mode of action of amitraz on worker honeybees *in vivo*, which, to our knowledge, had not yet been the subject of previous reports.

MATERIALS AND METHODS

Emerging worker bees (*Apis mellifica mellifica* L.) were collected on the brood combs, from operculate alveoli, just before they broke out and were immediately weighed. They were grouped in samples of about 50 individuals for 1 h, in order to obtain a homogeneous population.

The amitraz [*N*-methyl bis(2,4-xylyliminomethyl)amine] (MW 293) used in the experiments was provided by Cluzeau-Infolabo Ets (France). The injection solutions were prepared by dilution in 7.5% ethanol in water. The injected doses ranged from 0 to 2 nmol per bee. The phentolamine methanesulfonic solution (MW 377) [2-([*N*-(*m*-hydroxyphenyl)-*p*-toluidinomethyl]-2-imidazoline methanesulfonate] used as an α-blocker was a commercial preparation from Ciba-Geigy laboratories (Regitin at 10 mg/ml). Ethanol was added to a final concentration of 7.5%. The doses used were the same as those for amitraz. The injected volumes were 0.5 μl of 7.5% ethanol in water, amitraz, or phentolamine solution per individual.

The insects were kept in darkness at 28 ± 1°C. At intervals, a sample of about 20 μl of hemolymph was obtained by puncturing the dorsal aortas of each bee with a microsyringe and collected in microtubes at 0–4°C. An equal volume of an ethanol/pyridine mixture (4/1, v/v) was then added. After centrifugation for 10 min at 6000*g*, the supernatant, free of proteins and polymers of the melanin type, was immediately separated from the pellets.

For glucose and trehalose determinations, samples of 0.4 μl were spotted on precoated silica gel sheets (Merck) and chromatographed according to previously described techniques (Bounias, 1976).

Carbohydrates were separated by using three successive elution solvents: (i) and (ii) *n*-butanol/ethanol/acetic acid/water, 40/30/10/20 (v/v), 10 and 12 cm; and (iii) *n*-butanol/acetic acid/water, 60/20/20, 14 cm. Visualization was achieved by spraying 30 mg of *N*-(1-naphthyl)ethylenediammonium dichloride diluted in 10 ml of 5% sulfuric acid in methanol. The different compounds were determined from specific calibration curves of standards. Chromatograms were recorded at 540 nm using a Shimadzu CS 930 spectrophotometer. Straight calibration curves were established from an exponential conversion of the peak areas (Bounias, 1980b).

Eight bees were injected for each treatment and each incubation time, and then subdivided into two or three independent samples for analysis. Duplicate determina-

tions of glycemia were performed for each sample of bees. Trehalosemia (T) and glucosemia (G) were compared with the values obtained at time zero, without any treatment, T_0 and G_0, respectively. Comparisons between the different treatments were achieved using the method of paired data in which the average of the differences (control − treatment) were compared to their variances. The probabilities of significance were calculated from Student's t distribution with

$$t = |\delta|/S_\delta * N,$$

where δ is the average of the differences, S_δ is the standard deviation of δ, and N is the number of determinations.

The degrees of freedom were $\nu = N - 1$ for each series. The significance of the correlation coefficient was determined by the relation

$$t = |\nu\rho^2/(1 - \rho^2)|,^{1/2}$$

where $\nu = N - 2$ is the degree of freedom and ρ the correlation coefficient. The SD of the regression slopes (b) are $\sigma_b = [(b/\rho)^2 - b^2]/\nu$.

RESULTS

The average weight of the bees was 110.6 ± 5.3 mg (N = 350). The trehalosemia and the glucosemia obtained at time zero were respectively T_0 = 18.4 ± 5.4 mM and G_0 = 4.3 ± 1.1 mM for 23 samples of 3 or 4 bees. A significant positive correlation was observed between these two values: ρ = 0.72 ($P < 0.001$); b = 6.0 (σ_b = 1.2) No mortality was observed following injection of the control solution. A 10.6% mortality occurred 3 h after amitraz treatments. The average hemolymph volumes were 18.3 ± 5.0 μl (N = 37) before any treatment, 19.6 ± 2.4 μl (N = 8) 3 h after injection of 7.5% ethanol in water, and 15.4 ± 6.3 μl (N = 11) 3 h after amitraz injection. The volume variations between the different treatments were not statistically different. The fluctuations of glycemia in the controls (injection of 7.5% ethanol in water) resulted from the stress of manipulation, which has been observed in bees (Bounias and Pachéco, 1979b) and in American cockroaches (Downer, 1979).

Action of Amitraz

Figure 1 illustrates the variations in the concentrations of trehalose (T) and glucose (G) (by comparison with T_0 and G_0) following injections of 7.5% ethanol in water and two doses of amitraz (0.25 and 1.0 nmol per bee). The lowest level of amitraz (0.25 nmol) induced a hypertrehalosemia at 0.5 h (310%) and 2 h (420%) with high significance ($P_{0.5} < 0.05$ and $P_2 < 0.001$). However, a dose of 1 nmol had no significant effect on the glycemia within the first hour. A significant 80% depression ($P \approx 0.05$) of amplitude was detected at 3 h for the trehalosemia.

The glucosemia was greatly increased at 1 h (610%) and 3 h (580%), with respective levels of significance of ($P_{1\,h} < 0.001$ and $P_{3\,h} < 0.01$) following injection of 0.25 nmol of amitraz. At 1 nmol of amitraz per bee, an increase of 400% was observed at 0.5 h

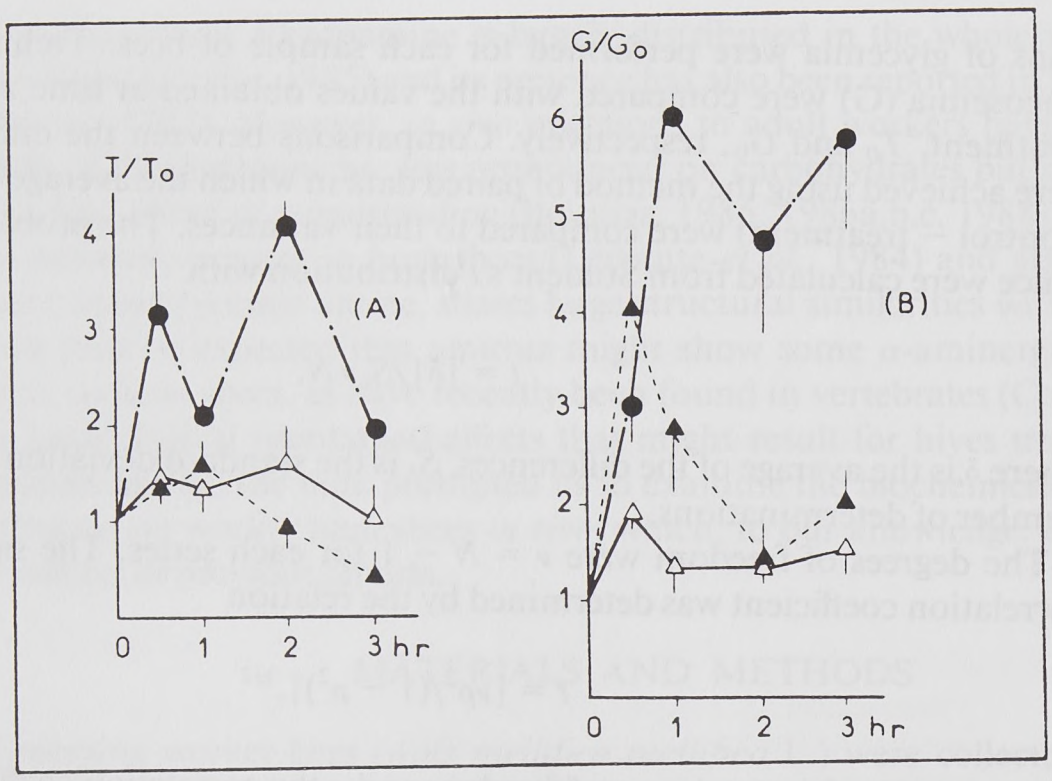


FIG. 1. Variations in honeybee hemolymph concentrations of trehalose (A) and glucose (B) following injections of amitraz at 0.25 nmol (●) and 1 nmol per bee (▲) and of pure solvent, i.e., 7.5% ethanol in water (△). Means and SD (vertical bars) of three determinations are given.

($P < 0.05$). The dose-related variations in hemolymph carbohydrate levels 45 min after injections of amitraz solutions are shown in Fig. 2. The concentration of trehalose increased at 0.25 and 2 nmol of amitraz ($P < 0.01$) compared to the initial level. An increase in glucose level was observed at medium doses (0.25 to 1 nmol).

Action of Phentolamine

Figure 3 illustrates the kinetics of variation in glycemia following the injection of 1 nmol of phentolamine. The observed decrease in trehalosemia is associated with

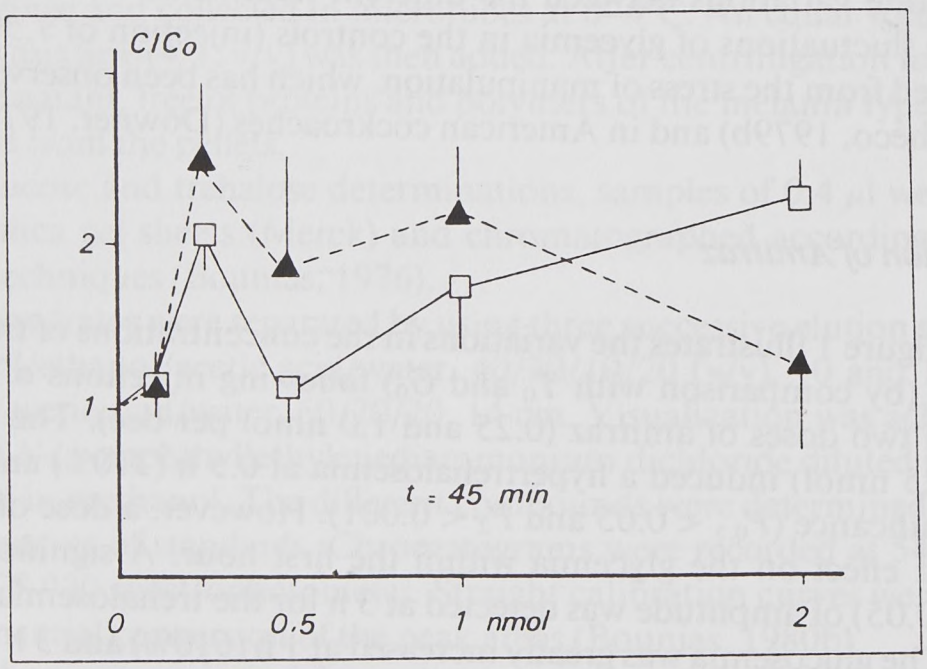


FIG. 2. Dose–effect relationship of injected amitraz and trehalosemia (□) and glucosemia (▲) in the honeybee, 45 min following injections. Means and SD of three determinations are given.

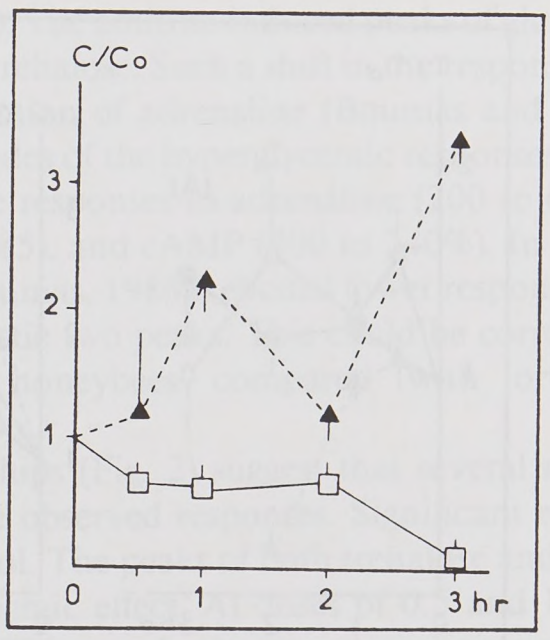


FIG. 3. Effects of pure phentolamine (1 nmol per bee) on the trehalosemia (□) and the glucosemia (▲) of the honeybee. Means and SD of four determinations are given.

an increase in glucosemia. A highly significant negative correlation between the respective concentrations of these compounds (Fig. 4) was recorded: $\rho = -0.89$ ($P < 0.05$); $b = -0.38$ ($\sigma_b = 0.10$); $N = 5$.

Interaction of Phentolamine

The effects of the association amitraz + phentolamine are depicted in Fig. 5. Simultaneous injection of the α-blocker (1 nmol per bee) and amitraz (0.25 nmol per bee) suppressed the hyperglycemia observed before injection (final level not significantly different from that of controls). Phentolamine injected in the presence of 1 nmol of amitraz per individual induced a significant decrease in trehalose concentrations at 2 h (−80%; $P < 0.001$), in contrast to an increase in glucosemia 1 h after injection (+280%; $P < 0.01$).

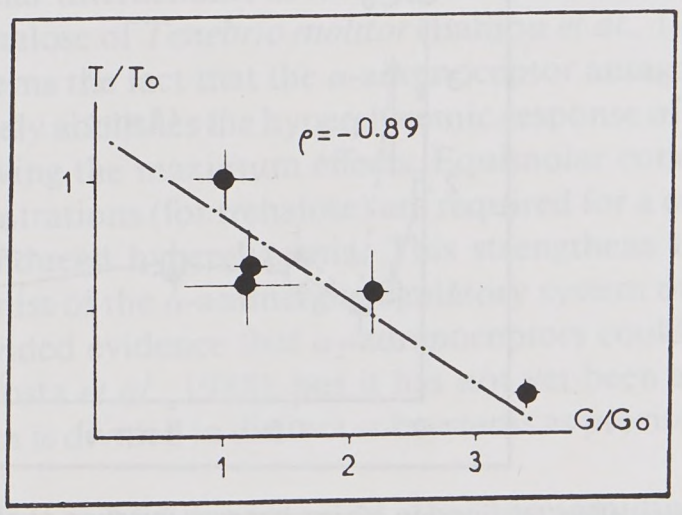


FIG. 4. Correlation between honeybee hemolymph trehalose and glucose concentrations, following injection of 1 nmol per bee. Means and SD of four determinations are given.

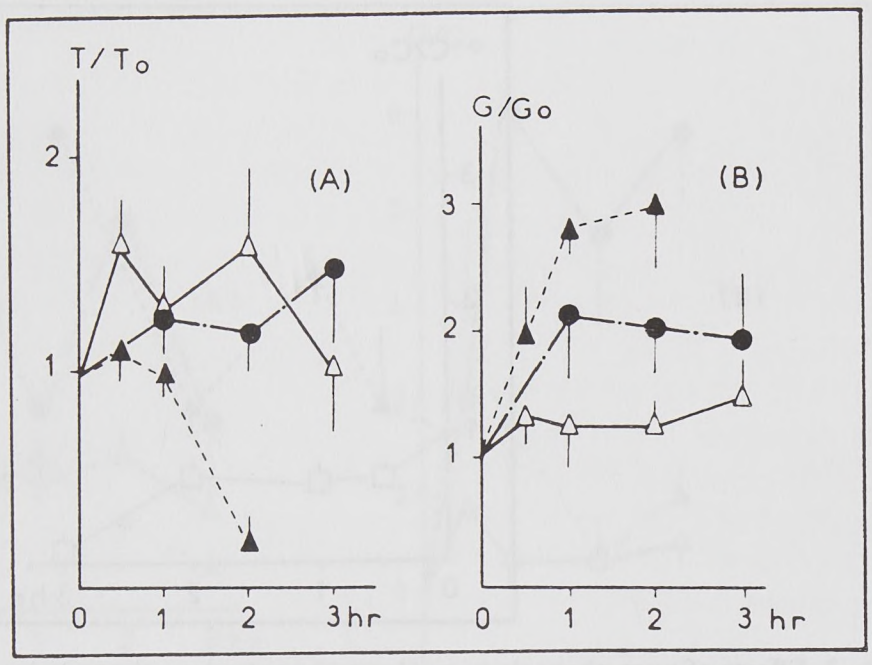


FIG. 5. Kinetics of interaction of 1 nmol phentolamine with amitraz at 0.25 nmol (●) and 1 nmol per bee (▲) on hemolymph trehalose (A) and glucose (B) concentrations. Controls (△) are bees injected with 7.5% ethanol in water. Means and SD for three determinations are given.

The dose-related action of phentolamine, in association with 0.25 nmol of amitraz 45 min after injection (Fig. 6), showed a rapid drop in the glycemia to concentrations not significantly different from control levels ($C/C_0 = 1$).

DISCUSSION AND CONCLUSION

The hyperglycemic response of worker honeybees to amitraz injections involves two successive phases, as has been previously indicated for cAMP action (Bounias, 1986a, 1987). It is interesting to note that, again, the injection of pure solvent elicits an attenuated response of the same type, which is consistent with a spontaneous aminergic discharge due to the stress. Such effects have also been encountered in

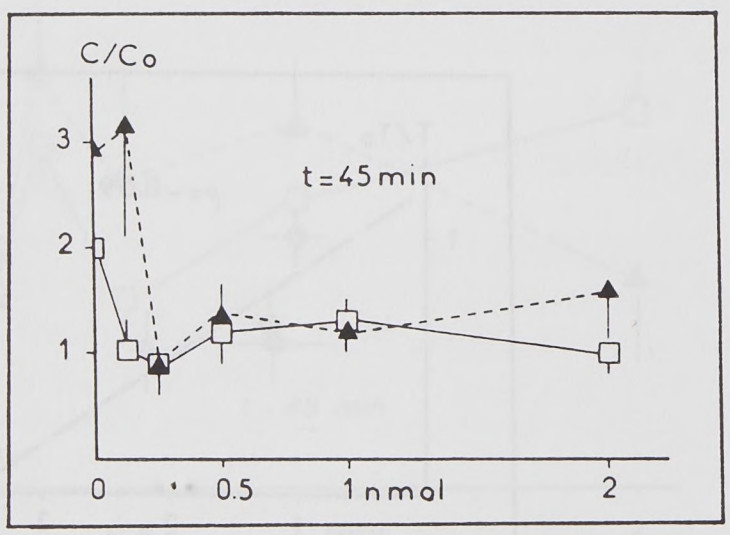


FIG. 6. Dose–effect relationship of simultaneous injection of phentolamine and 0.25 nmol amitraz and honeybee hemolymph trehalose (□) and glucose (▲) concentrations. Means and SD for three determinations are given.

other insects (Downer, 1979). The amitraz-induced peaks of glucose apparently occur later than those induced by trehalose. Such a shift in the response was also previously observed following the injection of adrenaline (Bounias and Pachéco, 1979). It is noteworthy that the amplitudes of the hyperglycemic responses to amitraz reach 300 to 600%, comparable to the responses to adrenaline (200 to 600%), noradrenaline (300 to 400%) (Bounias, 1985), and cAMP (200 to 240%). In contrast, octopamine injected at similar doses (Bounias, 1986a) elicited lower responses (120 to 220%) and did not show the characteristic two peaks. This could be correlated with the higher degree of evolution of honeybees compared with orthopterans (Fuzeau-Braesch, 1984).

The dose–effect relationships (Fig. 2) suggest that several mechanisms could be successively involved in the observed responses. Significant effects are observed at doses higher than 0.125 nmol. The peaks of both trehalose and glucose at 0.25 nmol likely reflect the pure aminergic effect. At doses of 0.5 and 1 nmol, a decrease in trehalose levels is observed. This may be due to a stimulation of trehalase activity, as previously found for the action of octopamine (Jahagirdar *et al.*, 1984). This effect disappears at higher doses, where the trehalose levels are not significantly different from those obtained at 0.25 nmol, indicating a saturation of the system or even a mechanism of inhibition by higher doses, as suggested by Fig. 1. The total carbohydrate content, expressed in relative glucose units, stabilizes at $C/C_0 = 5.60$ to 5.75 at 1 and 2 nmol.

The injection of pure phentolamine results in a continuous decrease in trehalose accompanied by a concomitant increase in glucose concentrations. The observed oscillations in glucose concentration could be related to the facts that honeybees are extremely fragile insects and that multiplying doses and times after injections rapidly results in insuperable practical problems. Nevertheless, the strength of the correlation obtained shows that during a 3-h period there is an average decrease of 0.38 ± 0.10 trehalose unit for each increase in glucose units. This ratio does not significantly differ from 0.5 to 1 ($P > 0.30$) and is quite consistent with the hypothesis of a sustained stimulation of trehalose hydrolysis following the injection of phentolamine.

These observations suggest that various structural analogs of the octopamine molecule may share more-or-less pronounced stimulatory effects on trehalose activities. Kinetic research should therefore be performed to obtain more detailed information on this interesting question, which may reflect a more general feature of direct hormone/enzyme molecular interactions, as recently shown for the effect of an insulin-like peptide on the trehalose of *Tenebrio molitor* (Bahjou *et al.*, 1986).

The last point concerns the fact that the α-adrenoceptor antagonist phentolamine promptly and completely abolishes the hyperglycemic response of amitraz at the amitraz concentrations giving the maximum effects. Equimolar concentrations or even half the amitraz concentrations (for trehalose) are required for a complete quenching of the formamidine-induced hyperglycemia. This strengthens the hypothesis that amitraz acts as an agonist of the α-aminergic regulatory system of the honeybee. Recent studies have provided evidence that α_2-adrenoceptors could be a formamidine target in mammals (Costa *et al.*, 1988), but it has not yet been ascertained that the insect aminergic system is divided in distinct subsystems as precisely as the vertebrate system.

Although the manner in which amitraz and other formamidines exert their lethal effects has not been elucidated (see Costa *et al.*, 1988, for review), their interactions

170

with the aminergic regulation of honeybee carbohydrate utilization may be the cause of important toxic effects. During their foraging activity, worker honeybees must fly long distances and return to the hives with heavy loads of pollen and nectar. If they fail to adjust their energy supply to the demand as accurately as possible, they may be obliged to land before reaching the hives and therefore run the risk of being the victim of a predator or paralyzed by the cold or humidity before being able to start again. Accordingly, thousands of bees might be lost in the fields without any chance of researchers finding a large number of poisoned individuals gathered in one area. This putative lack of biological symptoms of intoxication *ipso facto* extends to the possibility of finding pesticide residues: this problem will be more difficult because active doses are rather low and the amitraz molecule might be rapidly destroyed by the biochemically complex medium of a dead bee body.

Among other possible explanations, we are thus led to believe that this is one mechanism likely involved in the still unexplained losses of honeybee populations in many countries of intense agricultural activity.

REFERENCES

BAHJOU, A., MOREAU, R., BOUNIAS, M., GOURDOUX, L., AND DUTRIEU, J. (1986). Interaction moléculaire *in vitro* d'une substance apparentée à l'insuline avec l'activité tréhalasique du corps gras du coléoptère *Tenebrio molitor* L. *C. R. Acad. Sci. (Paris) Série III* **303,** 655–660.

BARBIER, E. (1986). *La pollinisation des Cultures. Pourquoi? Comment?* Le Pontet, France.

BOUNIAS, M. (1976). Micro-analyse quantitative par chromatographie en couche mince de quelques métabolites de l'hémolymphe d'insectes. I. Les glucides libres. *Analysis* **4,** 87–93.

BOUNIAS, M. (1980a). Cinétiques d'action de la noradrénaline, de la dopa et de la dopamine sur la glycémie de l'abeille *in vivo*. *Arch. Int. Biochem. Physiol.* **88,** 93–98.

BOUNIAS, M. (1980b). *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dichloride as a new reagent for nanomole quantification of sugars on thin-layer plates by a mathematical calibration process. *Anal. Biochem.* **106,** 291–295.

BOUNIAS, M. (1981). Blood sugar levels in workerbees of different races as an index of their honey production. *J. Apic. Res.* **20**(4), 215–220.

BOUNIAS, M. (1985). Effects anti adrénergiques du propanolol sur la glycémie de l'abeille *in vivo*. *C. R. Soc. Biol.* **179,** 218–223.

BOUNIAS, M. (1986a). Etude cinétique de la glycémie de l'abeille après injection de dl-octopamine *in vivo*. *C. R. Soc. Biol.* **180,** 512–519.

BOUNIAS, M. (1986b). Analogie de deux effecteurs hyperglycémiants: l'AMP cyclique et le glucagon injectés chez l'abeille *in vivo*. *C. R. Acad. Sci. Paris Série III* **302**(5), 141–144.

BOUNIAS, M. (1986c). Noradrenaline, propranolol and adrenochrome interactions with the dynamic of haemolymph lipids in worker honeybees. *Horm. Metab. Res.* **18,** 804–810.

BOUNIAS, M. (1987). Propanolol and somatostatin interactions with the hyperglycemic effects of glucagon, octopamine, noradrenaline and cAMP in worker honeybees *in vivo*. *Biochimie* **69,** 655–660.

BOUNIAS, M. (1988). Intéraction du propanolol et de la somatostatine avec la réponse octopaminergique de la lipémie de l'abeille *in vivo*. *C. R. Soc. Biol.* **182,** 37–43.

BOUNIAS, M., AND PACHÉCO, H. (1979a). Sensibilité de la glycémie de l'abeille à l'action de l'insuline et du glucagon injectés *in vivo*. *C. R. Acad. Sci. D* **289,** 201–204.

BOUNIAS, M., AND PACHÉCO, H. (1979b). Effets hyperglycémiants de l'adrénaline injectée chez l'abeille *in vivo*. *C. R. Acad. Sci. D* **289,** 33–36.

COSTA, L. G., OLIBET, G., AND MURPHY, S. D. (1988). Alpha$_2$-adrenoceptors as a target for formamidine pesticides. *In vitro* and *in vivo* studies in Mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **93,** 319–328.

DAVID, J. C., AND COULON, J. F. (1985). Octopamine in invertebrates and vertebrates. *Prog. Neurobiol. (Oxford)* **24,** 141–185.

DOWNER, R. G. H. (1979). Induction of hypertrehalosemia by excitation in *Periplaneta americana. J. Insect Physiol.* **25,** 59–63.

DOWNER, R. G. H., BAILEY, B. A., GOLE, J. W. D., MARTIN, R. J., AND ORR, G. L. (1984a). Estimation of octopamine and its role in the release of a hypertrehalosemia factor in the American cockroach, *Periplaneta americana.* In *Insect Neurochemistry and Neurophysiology* (A. B. Borkovec and T. Kelly, Eds.), pp. 349–352. Plenum, New York.

DOWNER, R. G. H., ORR, G. L., GOLE, J. W. D., AND ORCHARD, I. (1984b). The role of octopamine and cyclic AMP in regulating hormone release from *corpora cardiaca* of the American cockroach. *J. Insect Physiol.* **30**(6), 457–462.

DOWNER, R. G. H., GOLE, J. W. D., AND ORR, G. R. (1985). Interaction of formamidines with octopamine, dopamine and 5 H. T.-sensitive adenylate cyclase in the nerve of *Periplaneta americana. Pestic. Sci.* **16,** 472–478.

FAUCON, J. P., FLECHE, C., FLAMINI, C., AND SARRAZIN, C. (1986). Le traitement de la varroatose de l'abeille. Evaluation de diverses utilisations de la molécule d'amitraze. *Rev. Fr. Apic.* **455,** 25–37 et **456,** 457–459.

FOLZ, S. D., ASH, K. A., COUDER, G. A., AND RECTOR, D. L. (1986). Amitraz: A tick and flea repellent and tick detachment drug. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **9,** 150.

FUZEAU-BRAESCH, S. (1984). L'octopamine: Erreur métabolique ou vestige évolutif?. *Agressologie* **25,** 1–2.

HOLLINGWORTH, R. M. (1976). Chemistry, biology, activity, and uses of formamidine pesticide. *Environ. Health Perspect.* **14,** 57–69.

JAHAGIRDAR, A. P., DOWNER, R. G. H., AND VISWANATHA, T. (1984). Influence of octopamine on trehalase activity in muscle and hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Biochim. Biophys. Acta* **801,** 177–183.

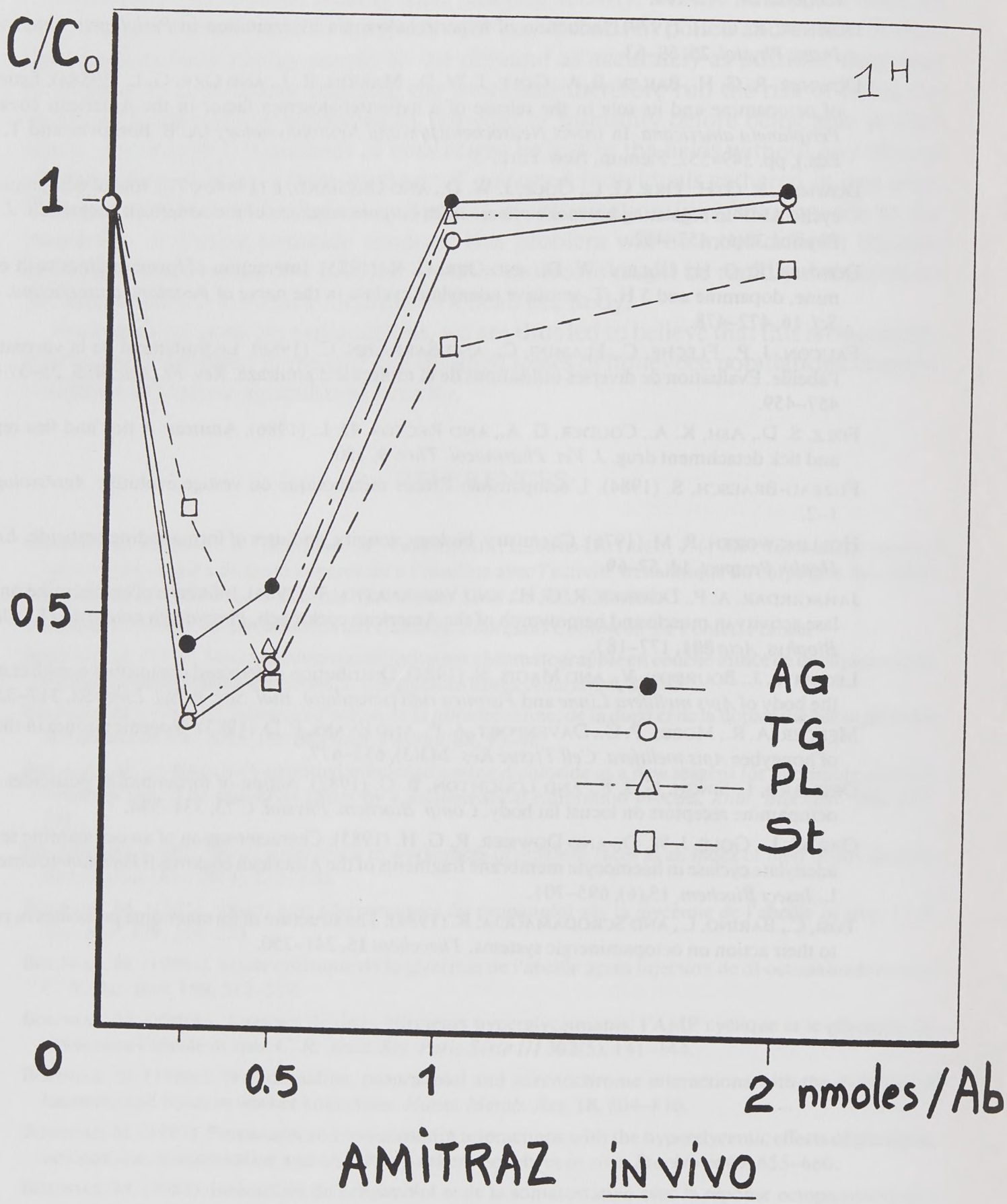
LECOMTE, J., BOURDON, V., AND MAGIS, N. (1984). Distribution of free and conjugated noradrenaline in the body of *Apis mellifera Linne* and *Formica rufa (sensulato). Bull. Soc. R. Sci. Liège* **53,** 317–322.

MERCER, A. R., MOBBS, P. G., DAVENPORT, A. P., AND EVANS, P. D. (1983). Biogenic amines in the brain of honeybee *Apis mellifera. Cell Tissue Res.* **243**(3), 655–677.

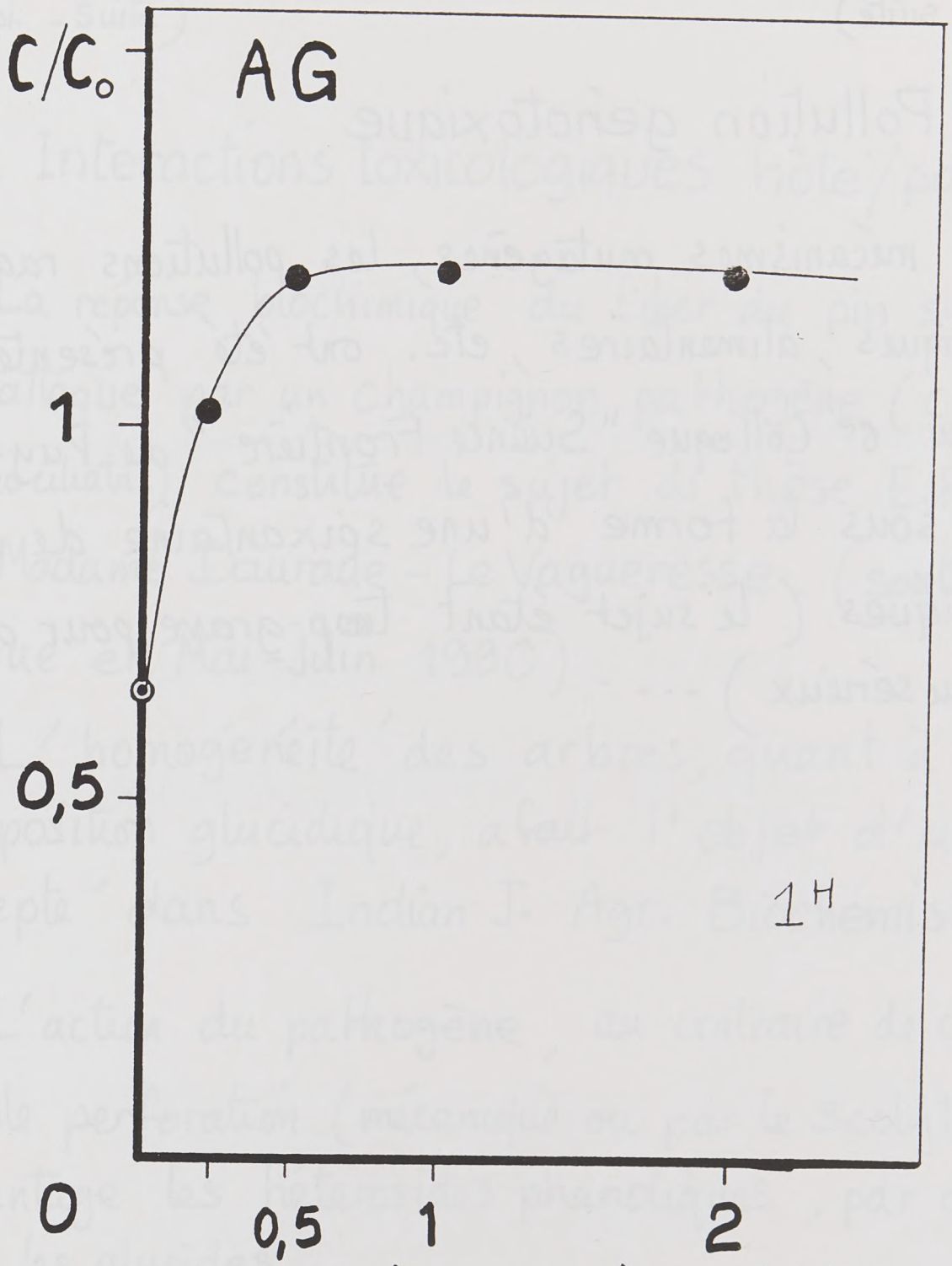
ORCHARD, I., SINGH, G. J. P., AND LOUGHTON, B. G. (1982). Action of formamidine pesticides on the octopamine receptors on locust fat body. *Comp. Biochem. Physiol. C* **73,** 331–334.

ORR, G. L., GOLE, J. W. D., AND DOWNER, R. G. H. (1985). Characterisation of an octopamine sensitive adenylate cyclase in haemocyte membrane fragments of the American cockroach *Periplaneta americana* L. *Insect Biochem.* **15,**(6), 695–701.

TOSI, C., BARINO, L., AND SCRODAMAGLIA, R. (1984). The structure of formamidine pesticides in relation to their action on octopaminergic systems. *Theochem* **15,** 241–250.



Effets hypolipémiants de l'amitraz injecté aux abeilles in vivo



Suppression par la phentolamine
des effets hypolipémiants de l'amitraz

3. La Pollution génotoxique

Les mécanismes mutagènes, les pollutions radioactives, atmosphériques, alimentaires, etc. ont été présentés au public du 6e Colloque "Science Frontière" de Puy-Saint-Vincent, sous la forme d'une soixantaine de dessins humoristiques (le sujet étant trop grave pour qu'on le prenne au sérieux)...

4. Interactions toxicologiques hôte/parasite

La réponse biochimique du liber du pin sylvestre à l'attaque par un champignon pathogène (Ceratocystis bruneociliata) constitue le sujet de thèse E.P.H.E. de Madame Daurade - Le Vagueresse - (soutenance prévue en Mai-Juin 1990) -

L'homogénéité des arbres, quant à la composition glucidique, a fait l'objet d'un mémoire accepté dans Indian J. Agr. Biochemistry -

L'action du pathogène, au contraire de celle d'une simple perforation (mécanique ou par le Scolyte), mobilise davantage les hétérosides phénoliques, par comparaison avec les glucides -

L'un de ces hétérosides (fraction H 19) diminue significativement au cours de l'infection : sa structure a donc fait l'objet d'une étude dont les premières conclusions ont été présentées provisoirement, dans un colloque international consacré aux phénols dans l'environnement -

Les produits de l'hydrolyse ont été, par ailleurs, également retrouvés in vivo, et l'analyse des données numériques et des enregistrements se poursuit en vue de publication -

MARSEILLE 19 et 20 Octobre 1989

COLLOQUE INTERNATIONAL

LES PHENOLS DANS L'ENVIRONNEMENT

ORGANISE PAR

- LABORATOIRE DE CHIMIE ET ENVIRONNEMENT UNIVERSITE DE PROVENCE - MARSEILLE
- A.G.H.T.M. (SECTION P.A.C.A.)
- CENTRE D'ETUDES ET RECHERCHES TECHNIQUES SOUS-MARINE - DCAN TOULON

SEPARATION ET IDENTIFICATION D'UNE FRACTION HETEROSIDIQUE PHENOLIQUE EXTRAITE DU LIBER DU PIN SYLVESTRE.

M.H. Daurade - Le Vagueresse et M. Bounias
Laboratoire de Biochimie, INRA Avignon, B.P.91,
84143 Montfavet Cedex, France.

RESUME. UNE FRACTION HETEROSIDIQUE DU LIBER DE *PINUS SYLVESTRIS* ISOLEE PAR HPLC, LIBERE EQUIMOLAIREMENT DU D.GLUCOSE PAR HYDROLYSE ACIDE ET SOUS L'ACTION D'UNE β GLUCOSIDASE. PAR CONTRE, LA LIAISON N'EST PAS ATTAQUEE PAR UNE α.GLUCOSIDASE. L'AGLYCONE LIBERE, CARACTERISE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE, PRESENTE UNE MOBILITE ET UN SPECTRE UV ANALOGUES A CEUX DE L'ALCOOL CONIFERYLIQUE. LA FRACTION ETUDIEE EST DONC IDENTIFIABLE AU β GLUCOSIDE DE L'ALCOOL CONIFERYLIQUE. SON IMPLICATION DANS LES RELATIONS HOTES/PARASITES EST EN COURS D'ETUDE.

SEPARATION ET IDENTIFICATION OF A PHENOLIC HETEROSIDE FRACTION EXTRACTED FROM THE SCOTCH FIR LIBER.

ABSTRACT. AN HETEROSIDE FRACTION EXTRACTED FROM LIBER SAMPLES OF *PINUS SLYVESTRIS* RELEASES AN EQUIMOLAR AMOUNT OF GLUCOSE FOLLOWING HYDROLYSIS BY CHLORHYDRIC ACID OR BY A β GLUCOSIDASE. BY CONTRAST, THE HETEROSIDE BOND IS NOT SPLITTED BY AN α GLUCOSIDASE. THE RELEASED AGLYCONE CHARACTERIZED BY TLC EXHIBITED A CHROMATOGRAPHIC MOBILITY AND A UV SPECTRUM ANALOGOUS TO THOSE OF CONIFEPYL ALCOHOL. THE STUDIED FRACTION CAN THUS BE IDENTIFIED TO THE β GLUCOSIDE OF CONIFERYL ALCOHOL. ITS INVOLVEMENT IN HOST-PARASITE INTERACTIONS ARE UNDER CURRENT RESEARCHES.

INTRODUCTION. Les réactions de défense des hôtes végétaux à l'attaque par des parasites et des pathogènes se traduisent souvent par des modifications de leur composition en phénols (1) et en glucides (2). Le végétal peut ainsi opposer à l'agresseur une barrière de lignification (3) (4) ou même le tuer à l'aide de dérivés phénoliques toxiques (5). Au cours de

l'étude de l'interaction entre les pins sylvestres (*Pinus sylvestris*) et les scolytes (*Ips sexdentatus*) ainsi que leurs champignons associés (*Ceratocystis brunneociliata*), nous avons donc été amenés à examiner la dynamique des variations des dérivés phénoliques et des glucides libres et conjugués dans le liber prélevé dans les zones infectées et dans des zones témoins. Ces recherches ont permis d'observer, en particulier, une réponse caractéristique au niveau d'une fraction hétérosidique dont il paraissait donc utile d'identifier la structure.

MATERIEL ET METHODES. La fraction etudiee, isolee initialement par HPLC est fortement enrichie en un composant principal designe par le code H19. Ce composant figure parmi 22 pics isoles par les techniques de CCM quantitative a l'echelle nanomolaire (6). Les glucides libres et les phenols libres ont ete separes, doses et caracterises par leurs spectres, soit apres revelation chimique (7), soit en absorbance directe dans l'U.V. (8), a l'aide d'un spectrodensitometre CS 930. Les essais d'hydrolyse de la liaison heterosidique ont ete realises en milieu HCl 2N final, a 50°C et en presence d'a glucosidase d'amande douce (Serva 22-823) ou de B glucosidase de levure (Serva 22-830) en milieu tampon phosphate 100 mM, a pH 6,8 et a 30°C . L'alcool coniferylique etalon a ete fourni par ALDRICH- USA.

RESULTATS. La figure 1 montre que l'hydrolyse acide de la fraction 19 partiellement purifiée libère principalement du glucose.

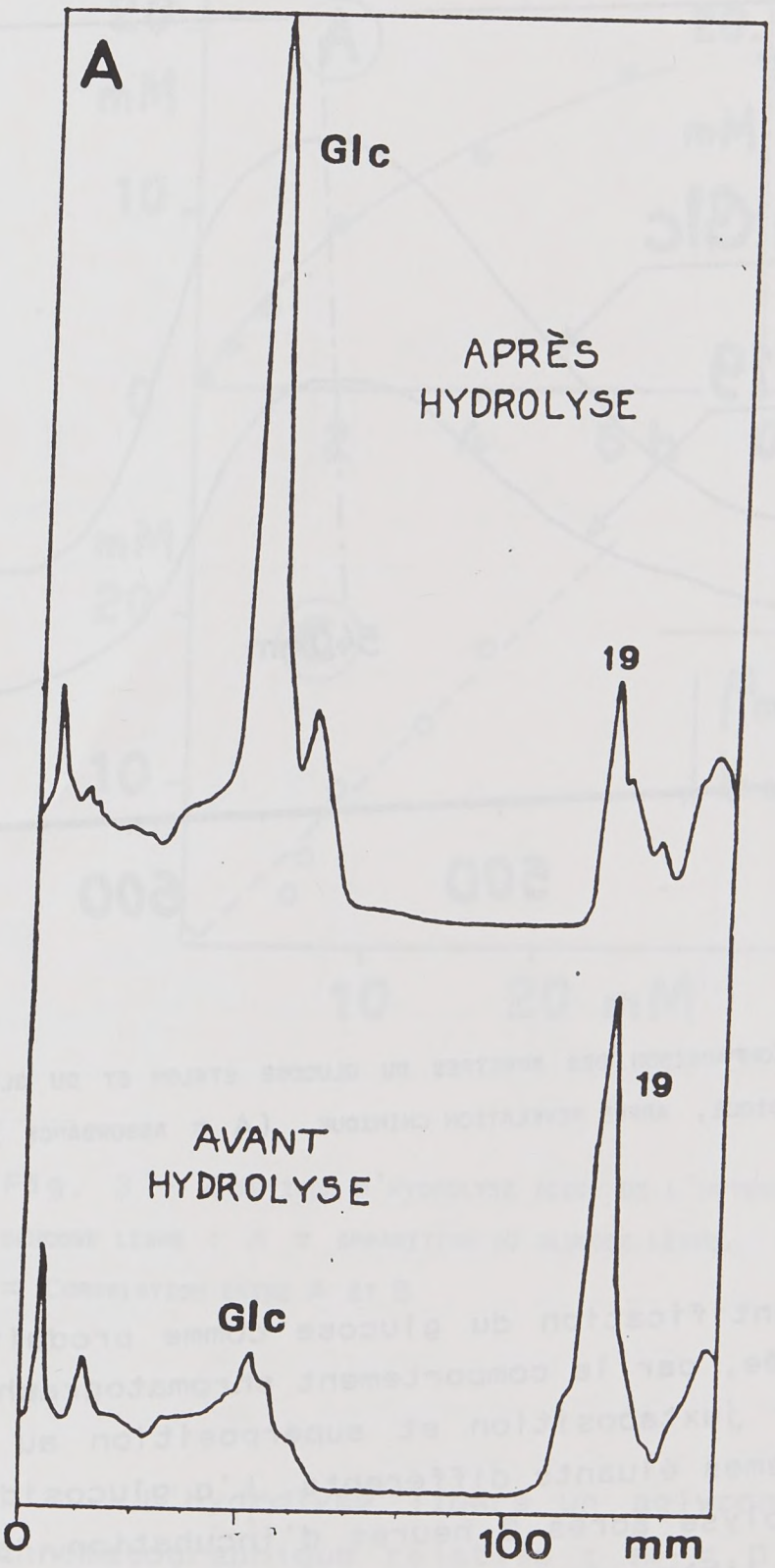


FIG. 1 - MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION DE L'EXTRAIT ETUDIE APRES HYDROLYSE ACIDE . LE PIC DE L'HETEROSIDE 19 DIMINUE FORTEMENT TANDIS QU'UN IMPORTANT PIC DE GLUCOSE APPARAIT. LES ABSORBANCES (A) SONT EN UNITES ARBITRAIRES.

Après révélation chimique, le spectre du glucose libre étalon est superposable à celui du composant glucidique de l'hétéroside *in situ* (avant hydrolyse) (fig. 2)

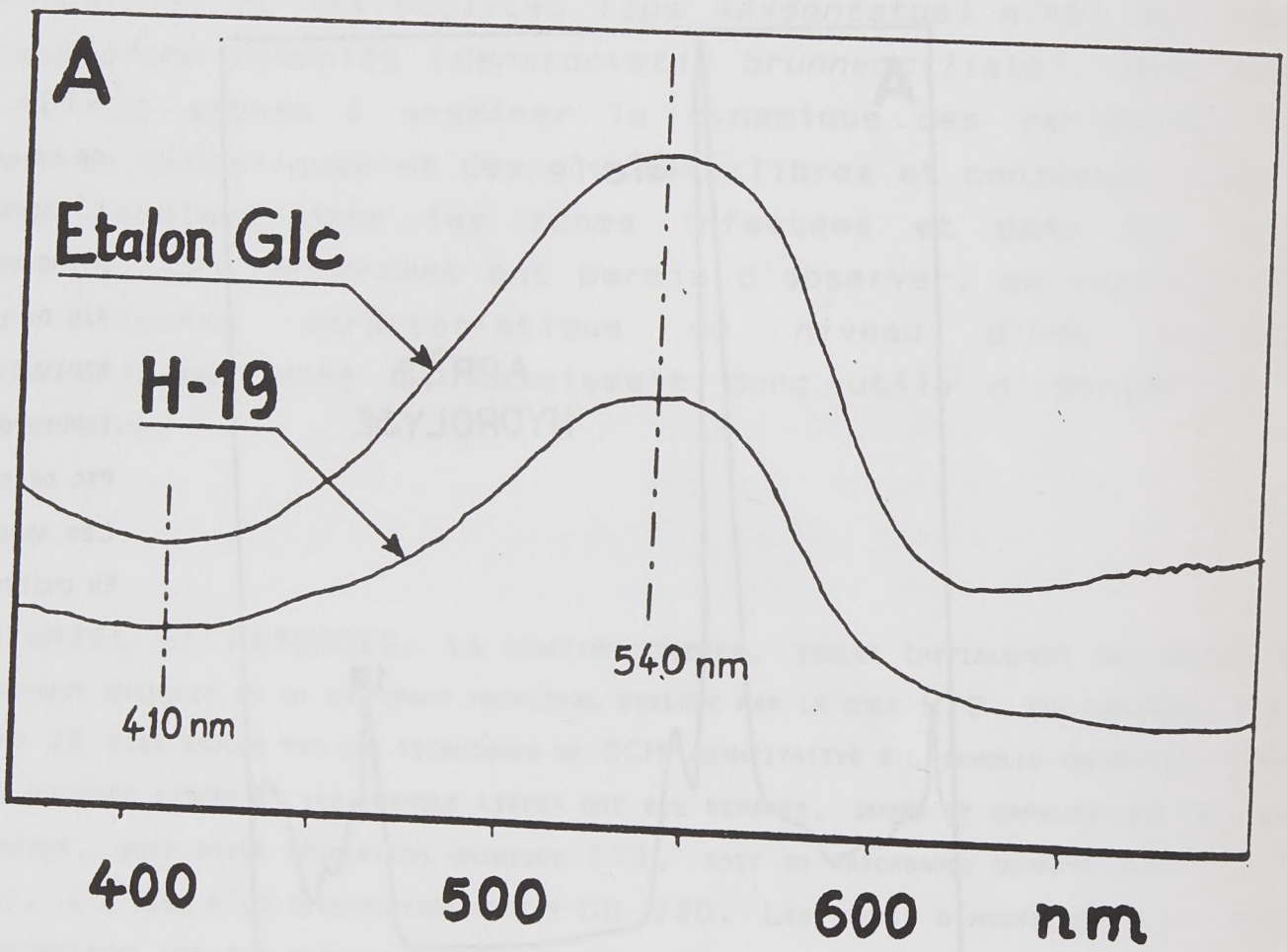


Fig. 2 - COMPARAISON DES SPECTRES DU GLUCOSE ETALON ET DU GLUCOSE IMPLIQUE DANS LA LIAISON HETEROSIDIQUE, APRES REVELATION CHIMIQUE. (A = ABSORBANCE)

L'identification du glucose comme produit d'hydrolyse a été confirmée, par le comportement chromatographique du glucose libéré, par juxtaposition et superposition au glucose étalon dans 4 systèmes éluants différents. L'α glucosidase ne provoque aucune hydrolyse après 2 heures d'incubation, tandis que la β glucosidase libère du glucose à raison d'une mole par mole de glucose hydrolysée sur l'hétéroside (Fig.3).

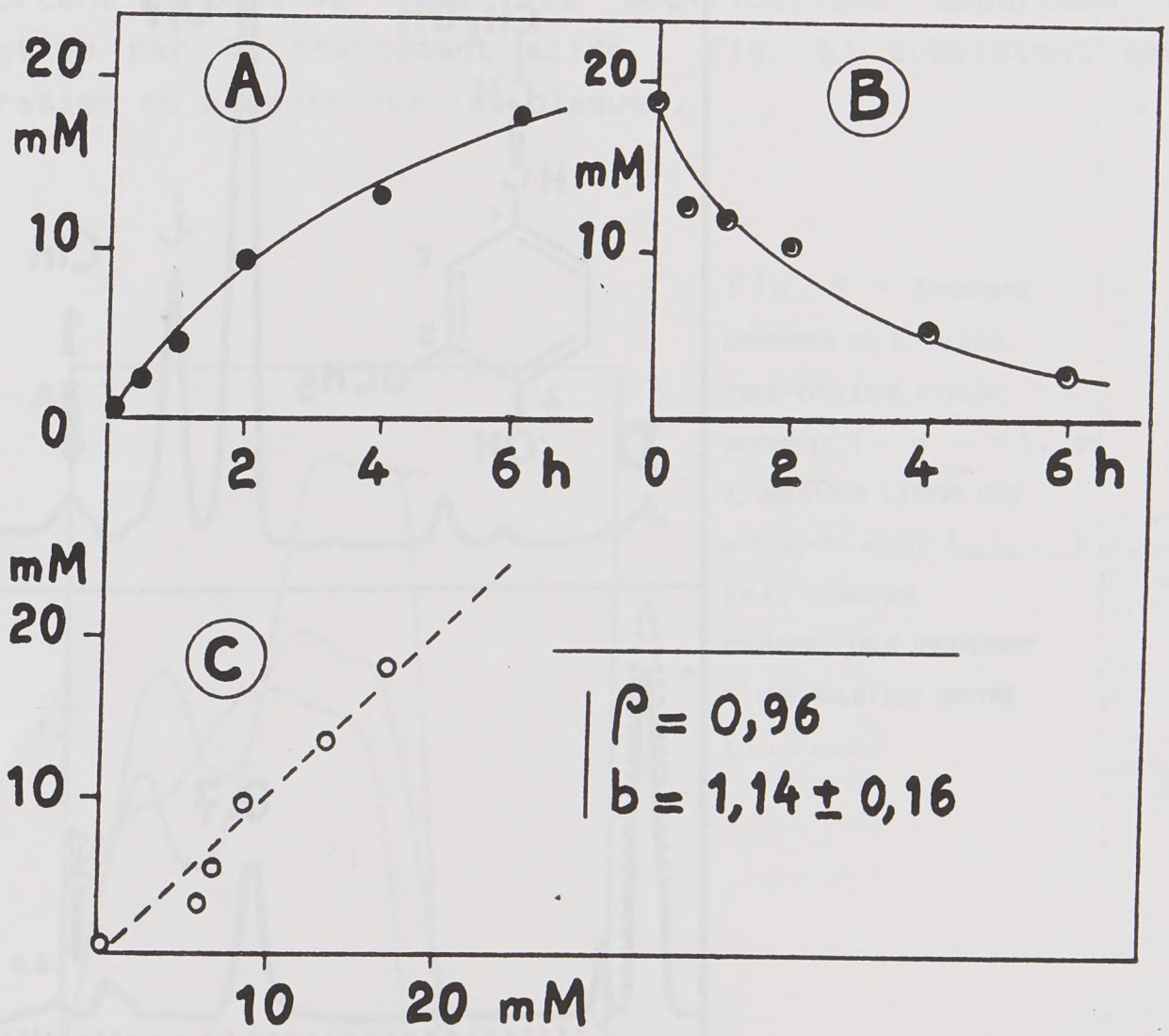


Fig. 3 - CINETIQUE D'HYDROLYSE ACIDE DE L'HETEROSIDE 19 CARACTERISE PAR LE DOSAGE DU GLUCOSE LIBRE : A = APPARITION DU GLUCOSE LIBRE. B = DISPARITION DU GLUCOSE LIE. C = CORRELATION ENTRE A ET B

L'hydrolyse libère un aglycone présentant une mobilité chromatographique relative : M_R = 0,70 par rapport à l'acide cinnamique, dans un système éluant établi pour les phénols libres (8). Cette propriété correspond à celle de l'alcool conifèrylique étalon (fig. 4)

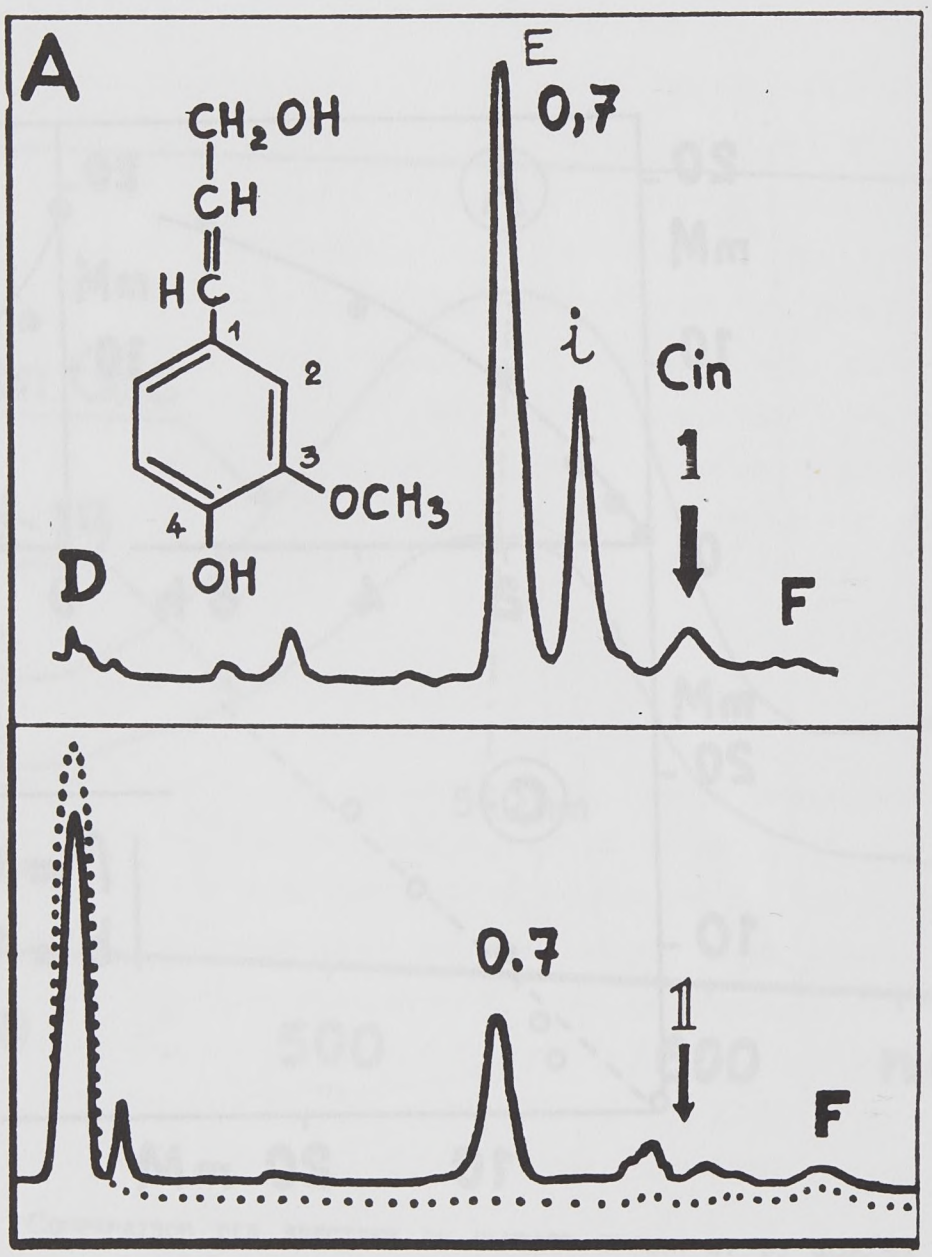


Fig. 4 – Mobilites chromatographiques comparees de l'alcool coniferylique (formule) et de l'aglycone libere par l'hydrolyse de la fraction 19 – Enregistrement du haut : D = Point de depot; E = etalon alcool coniferylique; i = impurete; Cin. = acide cinnamique; F = front de solvant – Enregistrement du bas : (.....) avant et (————) apres hydrolyse. (A = absorbance.)

Le spectre UV de l'aglycone libéré par l'hydrolyse acide coïncide avec celui de l'alcool conifèrylique préalablement incubé en milieu HCl dans les mêmes conditions. Il est

important d'observer que les modifications apportées aux spectres par le traitement acide (Fig. 5) subsistent après migration du produit sur les plaques.

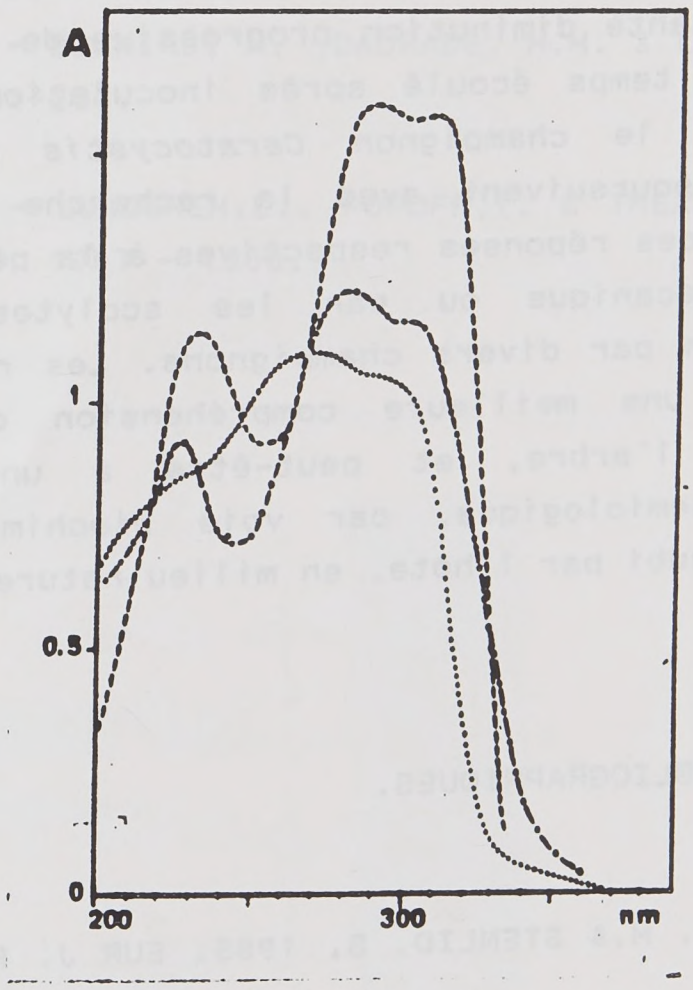


Fig. 5 - SPECTRES COMPARES DE L'ALCOOL CONIFERYLIQUE ETALON ACIDIFIE (- - - -), DE L'AGLYCONE LIBERE PAR HYDROLYSE ACIDE (_._._) ET DE L'ALCOOL CONIFERYLIQUE PROVENANT D'UNE SOLUTION NEUTRE (.....)

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. L'hétéroside H19 présente donc des caractéristiques permettant de l'identifier au ß glucoside de l'alcool conifé rylique. Ce résultat est concordant avec le

fait que les liaisons hétérosidiques déjà décrites pour d'autres composés, chez divers conifères, sont toutes de type ß (9). D'autre part, la prèsence d'un dérivé de l'alcool conifèrylique paraît d'autant moins surprenante qu'un dimère : l'alcool diconyfèrylique, a été identifié dans les aiguilles de pins (9). Par ailleurs, très peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la composition du liber des conifères, et l'originalité de nos résultats est renforcée par l'observation d'une importante diminution progressive de la fraction 19, en fonction du temps écoulé après inoculation expérimentale de l'arbre par le champignon *Ceratocystis bruneociliata*. Nos travaux se poursuivent avec la recherche des caractères de spécificité des réponses respectives à la perforation du tronc par voie mécanique ou par les scolytes, suivie ou non d'inoculation par divers champignons. Les résultats devraient conduire à une meilleure compréhension des mécanismes de défense de l'arbre, et peut-être à une possibilité de diagnostic sémiologique, par voie biochimique, du type de traumatisme subi par l'hôte, en milieu naturel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1 - JOHANSSON, M.& STENLID, S, 1985. EUR J. FOR. PATHOL. , *15*, 32-45.

2 - SHRIMPTON, D.M., 1973. CAN. J. BOT., *51*, 527- 534.

3 - BELL, A.A., 1981. Ann. Rev. Plant Physiol. ,32, 21-81

4 - STRACK , D., Heileman, J. & KLINKOTT, E., 1988. Z. Natur forsch., *43C*, 37-41.

5 - RAFFA, K. F. & BERRYMAN, 1983. Can. Entomol., *115*, 723-734.

6 - DAURADE - LE VAGUERESSE, M.H. & BOUNIAS, M., 1989- Indian J. Agric. Biochem. ,sous presse

7 - BOUNIAS, M. 1980. Analyt. Biochem. , *106*, 291 - 295.

8 - BOUNIAS, M. ,DAURADE, M.H. & LIZZI, Y. ,1989. Analusis, *17*, 201-204.

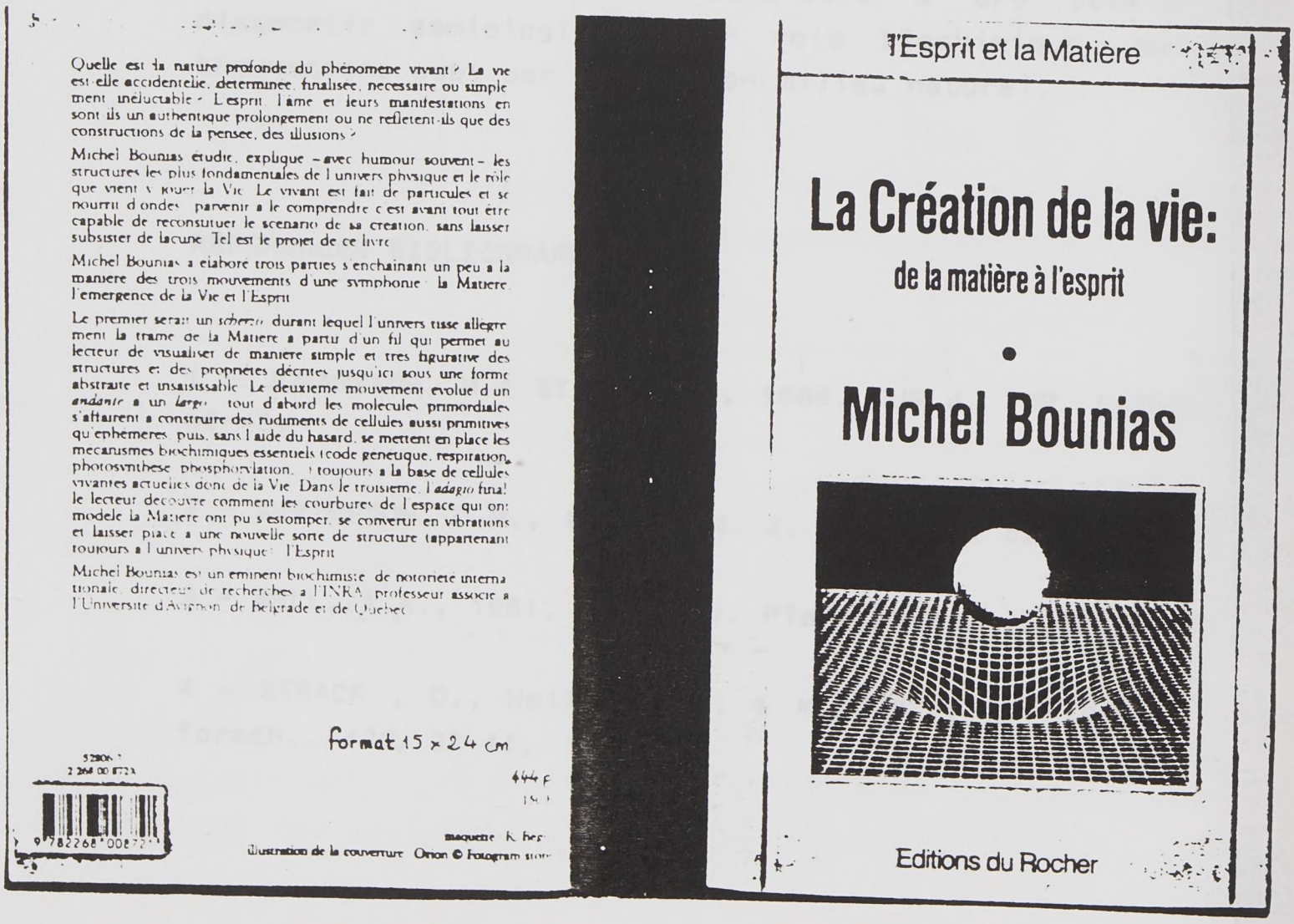
9 - LUNDGREN,L., POPOFF,T. & THEANDER, O.,1981.Phytochemistry, *20*, 1967 - 1969.

IX _ Mécanismes fondamentaux de la Vie _

_ LA CRÉATION DE LA VIE, : de la matière à l'esprit

La succession des mécanismes moléculaires qui ont conduit à la création des premières cellules vivantes, a été reconstituée en un scénario aussi complet que possible.

L'ouvrage, paru aux Editions du Rocher (444 p. 15 x 24 cm, ISBN 2 268 00 872 X) englobe la manière dont on pourrait se représenter, figurativement, la structure fondamentale de la matière, comme courbures et torsions de l'espace, et à quoi pourrait correspondre, éventuellement, le domaine physique de l'esprit. Ces spéculations sont présentées comme un jeu intellectuel, non comme une théorie.



X Enseignement supérieur

M. Bounias, Professeur associé, (rémunéré par le Ministère des Universités de 1986 à 1989 par tranches de 6 mois, et vacataire ensuite) a continué à assurer 3 types de cours :

- Statistiques biologiques (10 heures prévues)
- Enzymologie cinétique (" " ")
- Toxicologie (1 U.V. complète de 60 heures)

Pour des raisons pédagogiques, les deux premières matières (qui entrent dans les bases nécessaires à l'U.V.) ont bénéficié d'une extension à 30 heures et 25 heures, respectivement

Dans l'avenir, il serait intéressant de prévoir deux U.V. Complémentaires :

1) Interactions moléculaires et biologiques : 60 h.
   (Aspects statistiques et cinétiques)
2) Toxicologie générale : 60 h.

Deuxième partie :

COMPTE-RENDU FINANCIER

I- Introduction

Les avatars du Laboratoire de Biochimie, en matière de budget, tiennent à ce que sa ligne budgétaire propre : AVIGNON BIOCHIMIE 21-749 a été videé de son contenu, qui a été replacé dans la ligne 21-531 du Laboratoire de pollution.

Ceci permet au titulaire habituel de cette ligne d'œuvrer à sa guise quant à la répartition des allocations, d'une part, et des charges, de l'autre, entre les deux services. Le C.R. 17, 1988 présentait, en annexe, un échange de correspondance relatif au budget 1990. La dernière lettre du Laboratoire de Biochimie n'ayant pas fait l'objet de contestation, ses conclusions en ont été définitivement retenues, ici.

(C.R. financier)

II - Crédits

Les dotations 1990 se réparlissent à notre connaissance de la façon suivante :

Dotations du département : initiale	150 802,
Dotation supplémentaire	reste à préciser
Service des Relations Internationales :	12 000,
AIP Acétylcholinestérases (89-4665) :	50 000,
Direction générale	1 864,2
Cessions du Département	7 816,7
Reliquat de contrat 1986	env. 40 000,
Total :	
Déficit 1988 :	50 076,08

Crédit restant (non compris dotation suppl.) : 212 406,12 F

(C.R. financier)

III - Débits

1 - Bilan par agent

Mme N. Bareste (AJT - Secret. doc.)	6420,82
M. Belzunces (IE) Thèse Doctorat	96470,09
M. Bounias (D.R.)	52298,15
Mme Daurade (TR) Thèse EPHE	20688,73
Mme Nectoux (ext.) Thèse Doctorat	16044,08
Collaborations extérieures : (*)	17421,90
TOTAL	209343,77

(*) soit : Grande Bretagne : 36,88 %
Yougoslavie : 25,26 %
Univ. Montpellier : 21,40 %
Pologne : 16,45 %

non compris : RFA (Dotation séparée / programme PROCOPE)

SOLDE PROVISOIRE : + 3062,35 F
+ dotation suppl. du Dépt

NB - La part des charges est incluse dans le calcul des attributions initiales (révisé) -

2- Bilan par catégorie de dépenses

Matériel de Laboratoire :	15,42 %
Equipement :	14,84 %
Frais de publications :	12,33 %
Frais de déplacements :	9,37 %
Achats de Livres :	8,88 %
Indemnités de stages :	7,45 %
Fournitures administratives :	6,89 %
Produits chimiques :	5,32 %
Poste : affranchissements :	~4, %
Téléphone :	~2,1 %
Divers (photocopies, tirages documentation, frais de maintenance ...)	~12,5 %

C.R. financier

IV Perspectives

Quelques remarques doivent être soulignées, pour conclure ce chapitre.

① Le "Déficit" du Laboratoire de Biochimie est fictif.

Quelques rappels paraissent utiles : (F = fonctionnement, E = équipement)

Années	dotations	dépenses	solde "attribué"	remarques
1984	F 68530,00 E 61984,05	66 269,65 61 831,65	+152,40 (1)	1 part chercheur = 55 000, +1 thésard
1985	97 371,60	92 270,00	-26300, (2)	1 chercheur + 1 thésard (1 part = 55000)
1986	F 181360, E 150000 + solde contrat env. 40000 "déficit 85"	159583,42 144 795,25	...	2 chercheurs (1 part = 78065) + 4 thésards
1987	260 744,72	285420,04	...	2 chercheurs + 4 thésards (1 part = 74 412)
1988	F 206 940,96 E 300 000,	225 506,04 299 800,00	-50076	2 chercheurs 4 thésards (1 part =
1989	voir § II et III		-100 000 (3)	2 chercheurs +2 thésards (1 part = 50 000,)

(1) à déduire la part M.O.O. "femme de ménage".
(2) déficit à identifier...
(3) Solde réel + 30000 en comptant les dotations suppl./Départ accordées, le reliquat du contrat 1986 et un partage correct des dotations initiales.

1°. On observe que la "part chercheur" 1989 (50 000 F, équipement + fonctionnement) est inférieure à la part de fonctionnement de 1984 (55 000) soit 5 ans plus tôt.

2°. Aucune dotation n'a été attribuée pour les charges d'accueil de thésards - Deux d'entre eux ont dû abandonner la recherche en 1989, faute des moyens de survie.

3°. Le budget des publications représente 12,3 % des dépenses totales : il s'agit là d'une pénalisation des résultats de la recherche. Le nombre de publications, au cours des 5 années précédentes, se répartit comme suit (en fonction des dates de parution) :

1984	13 titres	/ 9 revues et coll.	différents
1985	9 "	5 "	"
1986	16 "	8 "	"
1987	11 "	7 "	"
1988	12 "	10 "	"

② La disparition du pose AJT correspondant aux fonctions de secrétariat-documentation

- va entraîner un surcroît de travail de bureau, y compris pesée et affranchissement du courrier, photocopies, classement et rangements divers, recherche des dossiers, etc. (bibliographie...)
- bloque l'activité de publication qui ne peut en aucun cas se dispenser de la dactylographie
  - ☐ Les manuscrits scientifiques devront être traités à l'extérieur, et facturés : 35 F la page (surpénalisation!)
  - ☐ Les documents administratifs seront manuscrits.